



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL –**  
**PGBIOEXP**

ANDRÉ VINICIUS CUNHA PEREIRA

O EFEITO COADJUVANTE DOS RECEPTORES SEMELHANTES A TOLL (TLRs)  
NA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM *Leishmania*  
*amazonensis*

PORTO VELHO - RO

2017



ANDRÉ VINYCIUS CUNHA PEREIRA

O EFEITO COADJUVANTE DOS RECEPTORES SEMELHANTES A TOLL (TLRs)  
NA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM *Leishmania*  
*amazonensis*

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
programa de pós-graduação em Biologia  
Experimental *stricto sensu* da Universidade  
Federal de Rondônia para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Experimental.

Porto Velho – RO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Fundação Universidade Federal de Rondônia  
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

---

P436e    Pereira, Andre Vinycius Cunha.

O efeito coadjuvante dos receptores semelhantes a toll (TLRs) na  
estimulação de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis* /  
Andre Vinycius Cunha Pereira. -- Porto Velho, RO, 2017.

67 f. : il.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dra. Giselle Martins Gonçalves

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Fundação Universidade  
Federal de Rondônia

1. toll like receptor. 2. *Leishmania amazonensis*. 3. Leishmaniose. 4.  
Macrófagos. I. Gonçalves, Giselle Martins. II. Título.

CDU 57:616.993.161

---

## RESUMO

PEREIRA, A. V. C. **O EFEITO COADJUVANTE DOS RECEPTORES SEMELHANTES A TOLL (TLRs) NA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM *Leishmania amazonensis***. Porto Velho, 2017. 66f. Mestrado em Biologia Experimental. Departamento de Medicina. Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

As leishmanioses são doenças que ocorrem em diversos países localizados nos trópicos e subtropicais do Velho e Novo mundo que constituem um importante problema de saúde pública em diversos continentes como Ásia, Europa, África e as Américas. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana consiste em uma doença de elevada prevalência causada por diferentes agentes etiológicos do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos vetores. O *Leishmania* é considerado um parasita do sistema fagocítico mononuclear (SFM), tendo como principal célula hospedeira em mamíferos, o macrófago. Os receptores semelhantes a *toll* (TLR) são uma classe de receptores que fazem o reconhecimento de diversos padrões moleculares que possuem propriedades antigênicas. Uma vez que os atuais tratamentos costumam produzir diversos efeitos adversos e levam ao desenvolvimento de resistência parasitária com o uso prolongado, dificultando a adesão ao tratamento, é fundamental, que se explore novas estratégias terapêuticas para o controle da infecção por *Leishmania*, inclusive com o auxílio do sistema imunológico do hospedeiro, para que uma resposta imunológica mais eficiente possa combater o parasita. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito coadjuvante dos receptores semelhantes a *toll* (TLR) na estimulação de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos de linhagem J774.A1 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade dos agonistas de TLR (LPS, Pam3CSK4 e CL075) e Glucantime®. Para avaliar o efeito sobre o crescimento/sobrevivência das formas amastigotas foram utilizados macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* incubados por 24h ou 72h (LPS: 25ng/mL, Pam3CSK4: 25ng/mL, CL075: 50ng/mL) e o sobrenadante foi recuperado para dosar a quantidade de citocinas (TNF-alfa, IL-10 e IL-12) pelo método ELISA. O Glucantime® produziu citotoxicidade em todas as concentrações testadas (23 a 39% de morte em células J774.A1). Os ligantes de TLR não produziram toxicidade significativa quando utilizados isoladamente ou em associação ao Glucantime®. O LPS, Pam3CSK4 e CL075 diminuíram o número de amastigotas intracelulares e o índice fagocítico e causaram alteração na morfologia dos parasitos fagocitados quando comparados com o controle (MØ infectados sem tratamento) após 24h e 72h. Resultado semelhante foi observado quando associados ao Glucantime®. Os ligantes LPS e CL075 induziram aumento nos níveis de TNF-alfa após 72h, mas não houve produção significativa de outras citocinas após os dois tempos observados. Esses resultados confirmam dados da literatura que mostram um papel importante dos TLR na infecção por parasitas do gênero *Leishmania*. Todavia, faz-se necessária a realização de estudos posteriores para avaliar a contribuição dos TLR na infecção por *L. amazonensis* e possíveis aplicações desses ligantes.

**Palavras-chave:** *toll like receptor*. *Leishmania amazonensis*. Macrófagos.

## ABSTRACT

PEREIRA, A. V. C. **THE COADJUVANT EFFECT OF TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRs) IN STIMULATING MURIN MACROPHAGES INFECTED WITH *Leishmania amazonensis***. Porto Velho, 2016. 66f. Master in Experimental Biology. Department of Medicine. Federal University of Rondônia - UNIR.

Leishmaniasis is a disease that occurs in many countries located in the tropics and subtropics of the Old and New World and still constitutes a major public health problem in several continents such as Asia, Europe, Africa and the Americas. In Brazil, American Tegumentary Leishmaniasis is a disease of high prevalence caused by different etiological agents of the genus *Leishmania* and transmitted by vector insects. *Leishmania* is considered a parasite of the mononuclear phagocytic system (FMS), having as main host cell in mammals, the macrophage. Toll-like receptors (TLRs) are a class of receptors that recognize various molecular patterns that have antigenic properties. Since the current treatments usually produce several adverse effects leading to parasite resistance with prolonged use, making treatment difficult, it is fundamental to explore new therapeutic strategies for the control of *Leishmania* infection, including with the aid of the system Immune response of the host, so that a more efficient immune response can combat the parasite. Thus, the general objective of this work was to evaluate the coadjuvant effect of toll-like receptors (TLR) on the stimulation of murine macrophages infected with *L. amazonensis*. J774.A1 lineage macrophages were used to assess the cytotoxicity of TLR agonists (LPS, Pam3CSK4 and CL075) and Glucantime®. In order to evaluate the growth / survival effect of amastigote forms, peritoneal macrophages infected with *L. amazonensis* were incubated for 24h or 72h (LPS: 25ng/mL, Pam3CSK4: 25ng/mL, CL075: 50ng/mL) and the supernatant was recovered to quantify the amount of cytokines (TNF-alpha, IL-10 and IL-12) by the ELISA method. Glucantime® produced cytotoxicity at all concentrations tested (23 to 39% death in J774.A1 cells). TLR ligands did not produce significant toxicity when used alone or in combination with Glucantime®. The LPS, Pam3CSK4 and CL075 decreased the number of intracellular amastigotes and the phagocytic index and caused changes in the morphology of the phagocytized parasites when compared to the control. Result was observed when associated with Glucantime®. The LPS and CL075 ligands induced increased levels of TNF-alpha after 72h, but there was no significant production of other cytokines after the times observed. These results confirm data from the literature that show an important role of TLR in infection by parasites of the genus *Leishmania*. However, more studies is needed to evaluate the TLR effect in *L. amazonensis* infection and the possible applications of this receptors ligands.

**Keywords:** toll like receptor. *Leishmania amazonensis*. Macrophages.

**Autor:** André Vinycius Cunha Pereira

**Título da Dissertação/Tese:** O efeito coadjuvante dos receptores semelhantes a *toll* (TLRs) na estimulação de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis*.

**Orientador:** Dra. Giselle Martins Gonçalves

**Co-orientador(es):** -

**Examinador: Assinatura:**.....

**Nome:** Dr. Christian Collins Kuehn

**Instituição:** Universidade Federal de Rondônia - UNIR

**Examinador: Assinatura:**.....

**Nome:** Dra. Alcione de Oliveira dos Santos

**Instituição:** Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RO

**Presidente: Assinatura:**.....

**Nome:** Dra. Giselle Martins Gonçalves

**Instituição:** Universidade Federal de Rondônia - UNIR

*Dedico este trabalho à minha família, meu Porto Seguro que  
me mantém em pé e me faz seguir em frente sempre.*

*“Que a felicidade não dependa do tempo, nem da paisagem, nem da sorte, nem do dinheiro. Que ela possa vir com toda simplicidade, de dentro para fora, de cada um para todos.”*

*Carlos Drummond de Andrade*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, todo poderoso, por permitir a vida e pela sua proteção em todos os momentos.

A minha família, por tudo o que fazem e por acreditar em mim, sem nunca desistir.

A minha Mãe, por me ensinar o que é viver, e me ensinar que buscar o conhecimento é fazer a diferença.

A minha orientadora, Giselle Gonçalves por compartilhar o conhecimento, me ensinar a trilhar um novo caminho e mostrar que o horizonte é muito mais distante do que imaginamos.

A FIOCRUZ RO e seus laboratórios pelo apoio e suporte durante a realização do trabalho.

A Prof. Carolina Bioni, Amália e à toda equipe do Laboratório PBML da FIOCRUZ RO.

Aos professores e coordenadores do programa PGBIOEXP pela transmissão do conhecimento e apoio durante a pós-graduação.

Aos colegas e amigos que fiz durante essa trajetória, pelo apoio, sugestões, conversas e pela participação neste processo de aprendizagem.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição das áreas de endemicidade da Leishmaniose cutânea no Mundo.....	11
<b>Figura 2.</b> Inseto flebotomíneo da espécie <i>Phlebotomus papatasi</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> no Brasil.....	14
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> no hospedeiro (homem).....	15
<b>Figura 5.</b> Resposta imunológica anti- <i>Leishmania</i> no organismo humano e polarização da resposta Th1 e Th2.....	19
<b>Figura 6.</b> Receptores semelhantes a <i>toll</i> , vias de sinalização intracelulares e efeitos mediados pelo receptor em humanos.....	21
<b>Figura 7.</b> Representação da possível modulação dos TLR pela interação com o <i>Leishmania</i> .....	23
<b>Figura 8.</b> Teste de citotoxicidade dos ligantes de TLR em macrófagos J774.A1.....	34
<b>Figura 9.</b> Teste de citotoxicidade dos ligantes de TLR + Glucantime® em macrófagos J774.A1.....	36
<b>Figura 10.</b> Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com LPS.....	38
<b>Figura 11.</b> Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com Pam3CSK4.....	40
<b>Figura 12.</b> Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com CL075.....	41
<b>Figura 13.</b> Análise do índice fagocítico em macrófagos 24h e 72h após a infecção.....	42
<b>Figura 14.</b> Macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com as drogas usuais ou com os ligantes de TLR isolados ou em associação.....	44
<b>Figura 15.</b> Dosagem de TNF-alfa no sobrenadante das células incubadas com os agonistas de TLR: TLR-2, 4, 7 e 8 (LPS, Pam3CSK4 e CL075) associados ou não ao Glucantime® após 24 e 72h.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
GTP – Guanosina Trifosfato  
IFN-gama – Interferon gama  
IL-1beta – Interleucina 1 beta  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-12 – Interleucina 12  
LPG - Lipofosfolicano  
LPS – Lipopolissacarídeo  
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana  
MGG - May Grünwald-Giemsa  
MTT- brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio  
NO – Óxido nítrico  
PAMP – Padrão Molecular associado ao Patógeno  
RNA – Ácido ribonucleico  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear  
Th1 – Linfócitos T *helper* do tipo 1  
Th2 - Linfócitos T *helper* do tipo 2  
TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral alfa  
TLR – Receptores semelhantes a toll

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 LEISHMANIOSE.....	11
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR.....	12
1.3 CICLO DE VIDA DO PARASITA.....	14
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE.....	16
1.5 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO.....	17
1.6 RECEPTORES SEMELHANTES A <i>TOLL</i> (TLRs).....	20
1.7 RECEPTORES SEMELHANTES A <i>TOLL</i> (TLRs) E A SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> EM HUMANOS.....	22
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 GERAL.....	26
2.2 ESPECÍFICOS.....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 ANIMAIS.....	28
3.2 PARASITAS.....	28
3.3 CULTIVO DE CÉLULAS J774.A1.....	29
3.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	29
3.5 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	30
3.6 INFECÇÃO E TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS <i>in vitro</i> .....	30
3.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS MACRÓFAGOS.....	32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 CITOTOXICIDADE.....	34
4.2 ENSAIO DE FAGOCITOSE.....	37
3.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS MACRÓFAGOS.....	44
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
REFERÊNCIAS.....	55

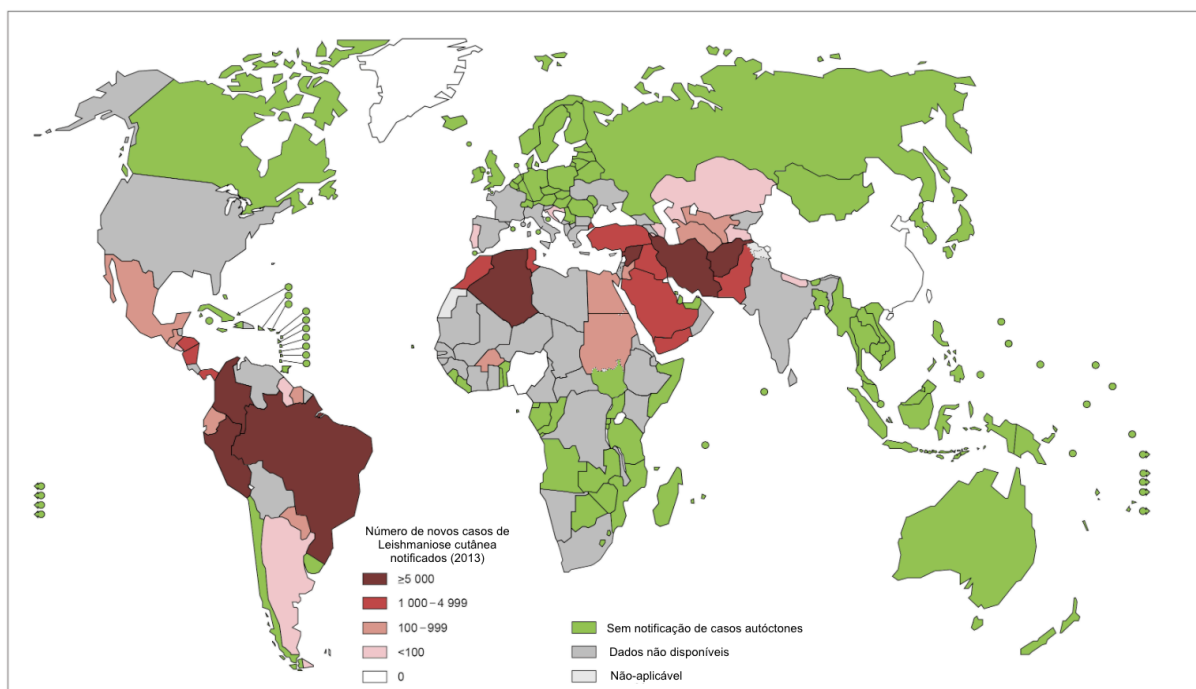
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças que ocorrem em diversos países localizados nos trópicos e subtropicais do Velho e Novo mundo e constituem um importante problema de saúde pública em diversos continentes como Ásia, Europa, África e as Américas. Essas doenças são causadas por diversos parasitas intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* transmitido por vetores em cerca de 98 países em vários territórios que sofrem ação antrópica (figura 1) (ALVAR et al., 2012; ESHETU; BASSA, 2016; STEVERDING, 2017).

O Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul registraram mais de 90% dos novos casos de Leishmaniose no ano de 2015 e estima-se que existam cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Apesar de ser uma doença que acomete milhares de indivíduos e constituir uma das mais prevalentes doenças parasitárias que afetam o homem, a Leishmaniose ainda é uma doença negligenciada (WHO, 2016).

**Figura 1.** Distribuição das áreas de endemicidade da Leishmaniose cutânea no Mundo



Fonte: WHO (2013)

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) consiste em uma doença de elevada prevalência causada por diferentes agentes etiológicos do gênero *Leishmania* e transmitida pela picada de um inseto fêmea da subfamília dos flebotomíneos. Devido a características sócio-econômicas e territoriais de abrangência dos vetores e aos diferentes padrões de transmissão, a LTA se torna uma doença de difícil controle no país. Somente no ano de 2015, foram identificados 20.187 casos de LTA no Brasil (WHO, 2016; SINAN, 2017).

A forma mais comum da doença é a Leishmaniose cutânea que ocorre endemicamente nas Américas, regiões do Mediterrâneo e na Ásia. Atualmente, a OMS estima cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos de Leishmaniose cutânea no Mundo por ano (FIGUEIRA et al., 2017).

No estado de Rondônia há uma prevalência significativa da doença e por isso, a LTA é considerada como um problema de saúde pública. Até o momento, foram identificadas espécies circulantes de *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* e *L. brasiliensis*. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) foram notificados 993 e 727 casos nos anos de 2010 e 2011, respectivamente. A partir de 2012 as notificações mostram uma ocorrência de mais de mil casos da LTA por ano (GALARDO et al., 2015; SINAN, 2017).

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR DA LEISHMANIOSE

Os causadores da doença, parasitas do gênero *Leishmania*, pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma denominação que abrange as formas cutânea, mucocutânea e difusa da doença nas Américas, sobretudo no Brasil onde têm sido detectado um número crescente de casos ao longo dos anos (BASANO; CAMARGO, 2004; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017).

O flebotomíneo (figura 2), é o inseto vetor comum de parasitas do gênero *Leishmania* que pertence à família *Psychodidae* e à subfamília *Phlebotominae*, do gênero *Lutzomyia* encontrado sobretudo no Novo Mundo e do gênero *Phlebotomus* encontrado no Velho Mundo. É conhecido popularmente em diferentes regiões do Brasil como “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui”, entre outros e podem ser encontrados em folhagens, árvores, tocas de animais e orifícios em rochas, solo ou

cavernas. Atualmente, uma das linhas de combate à essas doenças abordadas pela OMS é o controle vetorial para diminuir a transmissão do parasita (BASANO; CAMARGO, 2004; ARAUJO et al., 2016; GODOY et al., 2017).

**Figura 2.** Inseto flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*



**Fonte:** Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) (2006).

O parasita pode ser encontrado no flebotomíneo na sua forma flagelada (promastigota) e passa por diferentes transformações afim de aumentar a sua infectividade para o hospedeiro vertebrado, em que é encontrada a forma amastigota em diferentes tecidos do organismo (BATES, 2007; YAGHOOB-ERSHADI, 2012).

Foram identificados no Brasil sete espécies diferentes do parasita. As três principais são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que se manifesta pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas persistentes na pele, incluindo nasofaringe, *Leishmania (Viannia) guyanensis* caracterizadas por lesões mais simples e frequentes e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* que induz o surgimento de lesões cutâneas simples e em pequena quantidade (geralmente uma única lesão) e que pode ainda promover a forma difusa da doença (LYRA et al., 2015; TELES et al., 2015).

Além das três espécies supracitadas, já foram também identificadas no Brasil parasitas das espécies *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) lindenberg* e *Leishmania (Viannia) shawi*. O mapa abaixo mostra as localidades de ocorrência das sete espécies encontradas no país (figura 3) (FAGUNDES-SILVA et al., 2015; BASTOS; LINHARES; MADRID, 2016; FIGUEIRA et al., 2017).

**Figura 3.** Distribuição das espécies de *Leishmania* no Brasil



**Fonte:** BRASIL, 2010

### 1.3 CICLO DE VIDA DO PARASITA

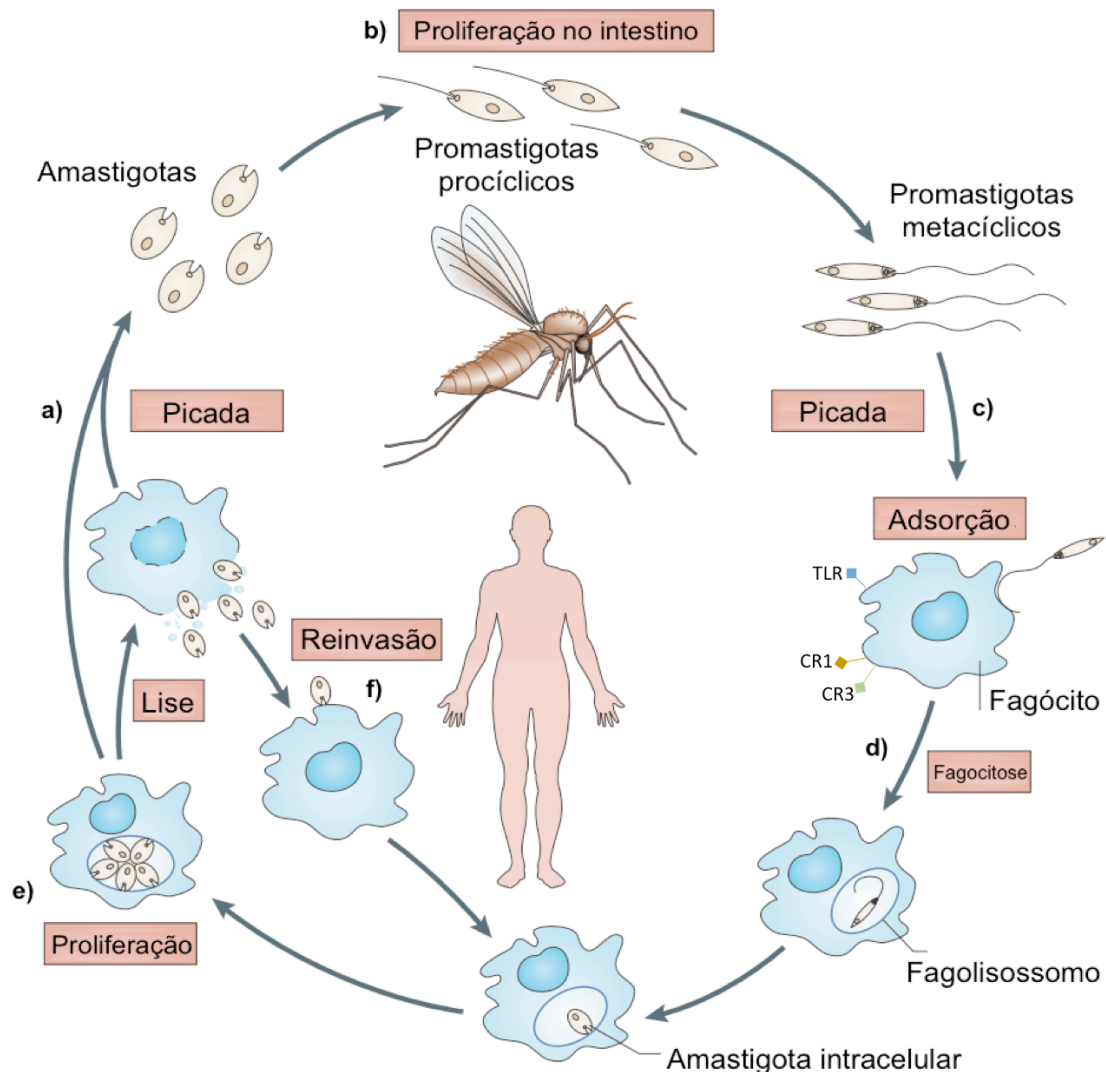
O inseto vetor através da picada, inocula, no hospedeiro vertebrado, as formas infectantes promastigotas metacíclicas aderem à superfície dos fagócitos e depois penetram na célula, onde se transformam em formas amastigotas após serem fagocitados e invaginados no fagolisossomo (Figura 3). Essas formas amastigotas podem se multiplicar dando origem a um número maior que em



determinado momento, causam lise da célula infectada, sendo liberados para o meio extracelular e aptos a infectarem novas células (KEDZIERSKI, 2010; MONTALVO et al., 2012).

Além de infectar novos fagócitos, em caso de uma nova picada pelo inseto vetor, durante o repasto sanguíneo, o inseto ingere as formas amastigotas do parasita. No intestino médio do inseto, o protozoário dá origem a uma forma denominada promastigota procíclica (forma reprodutiva e não-infectante) que evolui para a forma metacíclica (forma infectante) (figura 4) (ASHFORF, 2000; LI et al., 2017).

**Figura 4.** Ciclo de vida do parasita *Leishmania* no hospedeiro (homem).



a) o ciclo se inicia quando o flebotomíneo pica um hospedeiro vertebrado infectado (hematofagia); b) o parasita inicia a diferenciação das suas formas no tubo digestivo do inseto vetor; c) o inseto hematófago pica um novo hospedeiro vertebrado; d) o parasita é fagocitado por células do sistema

imunológico onde inicia sua diferenciação no hospedeiro dando origem às formas amastigotas intracelulares; e) o parasita se prolifera no interior da célula causando a sua lise e pode ser ingerido pelo inseto (a) ou invadir novas células no mesmo hospedeiro (f).

**Fonte:** KAYE; SCOTT, 2011 (adaptado).

#### 1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

As diversas espécies de *Leishmania* podem causar a doença nas formas cutânea, muco-cutânea e difusa, que afetam a pele e as mucosas, e ainda a forma visceral, que afeta as vísceras e são responsáveis por milhares de mortes todos os anos. Essas manifestações no indivíduo se desenvolvem de acordo com a espécie do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro frente a esse parasitismo (BRASIL, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

As espécies conhecidas como *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* são, geralmente responsáveis pela forma visceral e mais agressiva da doença. As manifestações cutâneas e muco-cutâneas da doença são causadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*, entre outras (PEACOCK et al., 2007).

Na forma visceral, também conhecida como “calazar”, há o desequilíbrio entre a multiplicação do parasita nas células do sistema fagocítico-mononuclear e a atuação adequada do sistema imunológico do hospedeiro que levam ao acometimento das vísceras, como rins, pulmões, fígado e baço. O paciente, geralmente apresenta sinais clínicos como hepatoesplenomegalia, febre baixa, micropoliadenia e anemia (GONTIJO; MELO, 2004; SAHA et al., 2017; PANAGOPOULOS et al., 2017).

A forma cutânea é caracterizada por apenas uma ou múltiplas lesões ulcerosas na pele (geralmente indolores) que surgem cerca de 2 a 3 meses após a picada do inseto. Essas lesões são úmidas, possuem bordas avermelhadas em alto relevo e são acompanhadas de uma secreção purulenta de odor fétido. Na forma muco-cutânea, ocorre o desenvolvimento de lesões nas mucosas nasal e oral, causando sequelas graves e irreversíveis na maioria dos casos, deixando o indivíduo com prejuízo funcional e estético importantes (ASHFORD, 2000; BAINS et al., 2016; BORGHI et al., 2017; MOHAMMADPOUR et al., 2017).

*Leishmania amazonensis*, também está frequentemente associado à forma difusa da Leishmaniose caracterizada por evoluir progressivamente e por apresentar lesões em toda a extensão do corpo, porém, sem aspecto ulceroso, como o

observado na Leishmaniose muco-cutânea. As feridas possuem características verrucosas que descamam e apresentam coloração e relevo alterados (HASHIGUCHI et al., 2016; BLUM-DOMINGUEZ et al., 2017).

## 1.5 RELAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO

As alterações bioquímicas que ocorrem no parasita ainda na fase de vida no flebotomíneo e as substâncias presentes na saliva do vetor são fatores que influenciam a infecção parasitária no homem. Uma vez que o parasita consegue penetrar no organismo humano, este sofre reconhecimento pelo sistema imune e, frequentemente, sobrevive à tentativa de neutralização devido à sua resistência aumentada (KAYE; SCOTT, 2011).

O *Leishmania* é um parasita do sistema fagocítico mononuclear (SFM), tendo como principal célula hospedeira em mamíferos, o macrófago. Formas promastigotas metacíclicas aderem à membrana celular através da glicoproteína 63 (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG) que podem interagir com fragmentos C3 do complemento, possibilitando a opsonização e fagocitose do parasita (mediada pelos receptores CR1 e CR3 no macrófago) e é então internalizado em uma vesícula denominada fagossoma de aspecto vacuolizado. No interior da vesícula, o parasita se diferencia em amastigota e assim, sofre sucessivas divisões celulares responsáveis pela sua proliferação intracelular (YAO; DONELSON; WILSON, 2003; GARG et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2013).

O macrófago possui mecanismos de combate ao parasita, porém, nem sempre apresenta êxito nesse processo. Após a fusão do lisossomo e do vacúolo contendo o parasita (fagossomo), dando origem ao fagolisossomo, a célula pode ativar mecanismos de defesa através da produção de espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio). Porém, os parasitas presentes na forma amastigota resistem de forma eficiente à tentativa de combate desencadeada pelo macrófago (BOGDAN; ROLLINGHOFF; SOLBACH, 1990; HANDMAN; BULLEN, 2002; GURUNG; KANNEGANTI, 2015; FALCÃO et al., 2016).

Contudo, essa resposta do macrófago ao parasito pode ser incrementada com o auxílio de linfócitos (Figura 5). Durante a infecção, o reconhecimento e apresentação dos antígenos de *Leishmania* pelo macrófago aos linfócitos é de

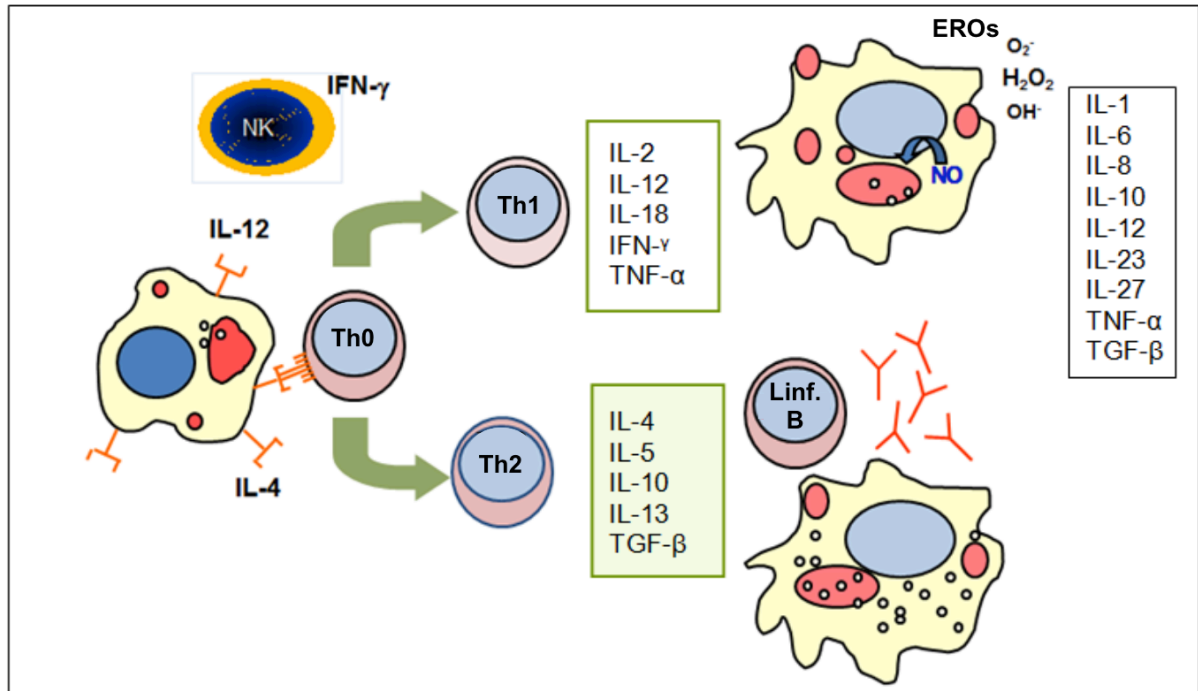
fundamental importância para o estabelecimento de uma resposta eficaz. Essa comunicação entre as células resulta em uma ativação do macrófago deixando-o com uma maior capacidade de fagocitar e digerir o parasita, culminando com a eliminação parasitária. A forma amastigota do *Leishmania* possui uma sensibilidade aumentada à ação de espécies reativas de oxigênio e por isso, a produção de moléculas oxidantes pelo macrófago é um dos principais e mais eficazes mecanismos de combate ao parasita (BERMAN, 1997; BARBIER; CINTRAT; GILLET, 2016).

Caso o linfócito Th0 sofra ação de citocinas como IL-12, inicia sua diferenciação para células Th1 responsáveis pela ativação de uma resposta inflamatória que contribui para o controle eficaz da infecção pelo parasito. Por outro lado, através da ação de IL-10 e IL-4 o linfócito Th0 se diferencia em Th2 que produz citocinas anti-inflamatórias induzindo uma resposta ineficaz para o controle efetivo da infecção e geralmente está associada à produção de anticorpos pelos linfócitos B e cronificação da doença (figura 5) (HERWALDT, 1999; KIMA, 2007).

Ademais, o desencadeamento de uma resposta imunológica eficiente está relacionado ao aumento da expansão clonal de linfócitos T *helper* 1 (Th1) em que a citocina IL-12 exerce um papel primordial aumentando a diferenciação dessas células. Devido à essa ação, a IL-12 é utilizada como um adjuvante vacinal para incrementar a resposta imunológica contra antígenos contidos na vacina, como contra o vírus Influenza, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, entre outros (BUCHANAN et al., 2001; SMILEY, 2008; METZGER, 2010).

A IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos como os macrófagos e células dendríticas a partir da interação entre CD40 presente nestas células e CD40L presente em linfócitos T. Posteriormente, essa citocina atua sobre os linfócitos T aumentando a expressão de IFN-gama. Notavelmente, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF-alfa são essenciais ao combate do parasita, pois induzem a ativação do macrófago de forma significativa, uma vez que, ativa receptores intracelulares que culminam com o aumento da expressão de enzimas responsáveis por aumentar o metabolismo oxidativo, causando a morte do parasita (figura 5) (AFONSO et al., 1994; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995; PEARSON; SOUZA, 1996; CUNNINGHAM, 2002; MOAL et al., 2016).

**Figura 5.** Resposta imunológica anti-*Leishmania* no organismo humano e polarização da resposta Th1 e Th2



**Th0:** linfócito T *helper* 0, **Th1:** linfócito T *helper* 1, **Th2:** linfócito T *helper* 2, **IFN $\gamma$ :** interferon gama, **NK:** célula *natural killer*, **TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa, **IL:** interleucina, **TGF- $\beta$ :** fator de crescimento transformador beta, **EROs:** espécies reativas de oxigênio, **NO:** óxido nítrico.

**Fonte:** PASSOS, 2012 (adaptado)

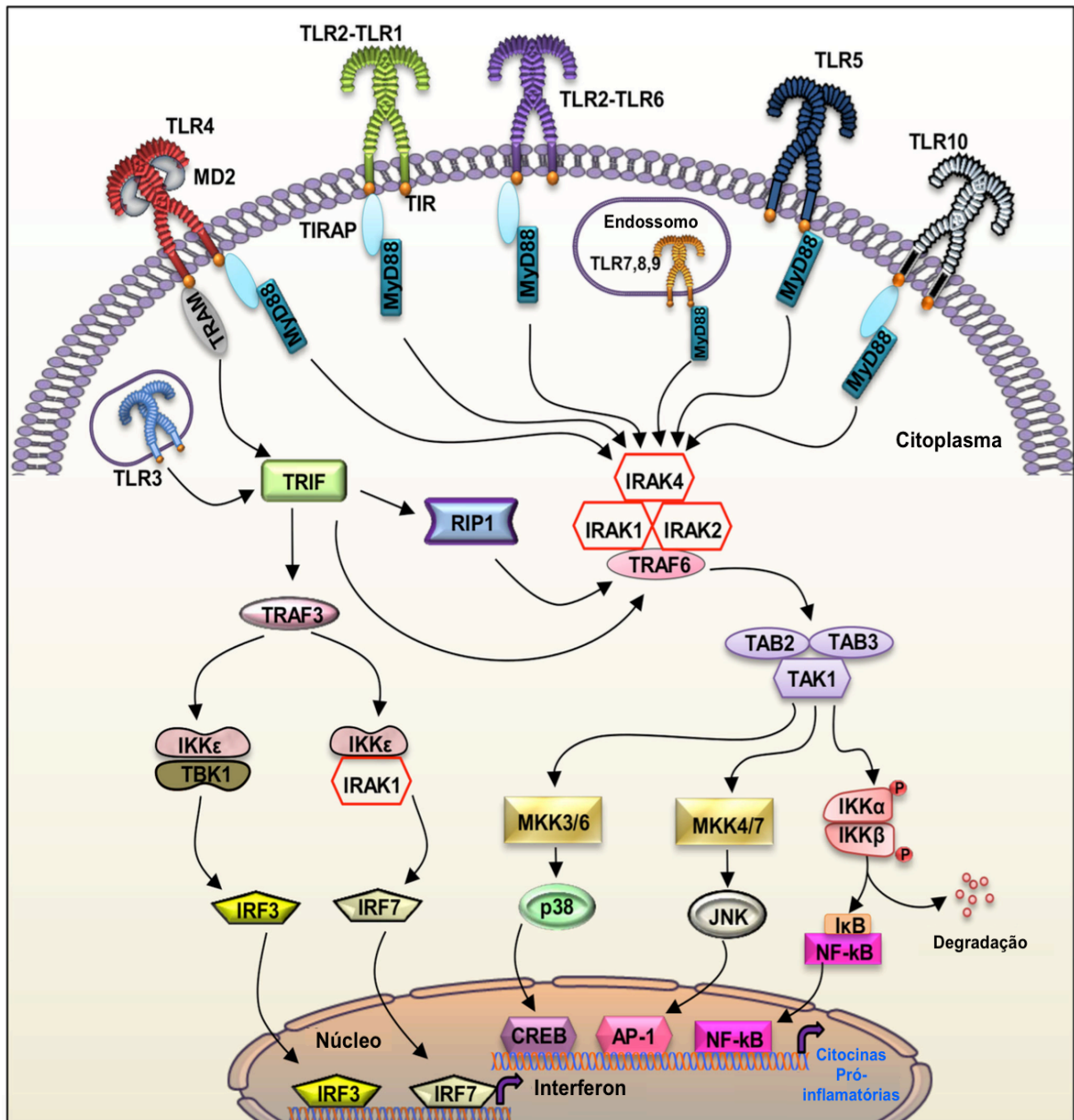
De modo contrário, a ativação de uma resposta imune do tipo Th2 (em vista do aumento da expansão clonal de células T *helper* 2 pela ação da IL-10, figura 5) tende a inibir a capacidade antiparasitária do sistema imunológico, uma vez que, resulta em diminuição da produção de óxido nítrico, da IL-12 e do potencial leishmanicida do macrófago. A IL-10 pode ser secretada por diversas células do sistema imune que também participam da resposta contra o parasita, como linfócitos Th1, T CD8+ e B, células dendríticas e *Natural Killer* (células NK). Essa citocina está relacionada a progressão da forma visceral da Leishmaniose humana e desempenha um importante papel anti-inflamatório por diminuir ativação dos macrófagos pelo IFN-gama e também a expressão do complexo maior de histocompatibilidade II (MHCII) (PEARSON; SOUZA, 1996; MILES et al., 2005; ANDERSON et al., 2007; RONET et al., 2010; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015).

## 1.6 RECEPTORES SEMELHANTES A *TOLL* (TLRs)

Os receptores semelhantes a *toll* (TLR) são uma classe de receptores que fazem o reconhecimento de diversos padrões moleculares que possuem propriedades antigênicas. Esses receptores estão envolvidos principalmente na resposta imune inata, mas também desempenham um importante papel na imunidade adaptativa, por reconhecer “padrões moleculares associados a patógenos” (PAMPs) e induzir uma resposta imunológica contra esses patógenos (AKIRA; TAKEDA, 2004; PARKER; PRINCE; SABROE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Os TLRs são assim denominados devido ao fato de que a primeira proteína desse grupo a ser identificada foi a proteína Toll encontrada em moscas do gênero *Drosophila*. Após a descoberta de que essa proteína exercia uma importante função no reconhecimento de microorganismos, foram identificados diversos receptores semelhantes em mamíferos, então, denominados “*toll-like receptors*”. Existem genes de TLR expressos em seres humanos encontrados principalmente em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (TAKEDA; AKIRA, 2004; SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012; ASHOUR, 2015).

**Figura 6.** Receptores semelhantes a *toll*, vias de sinalização intracelulares e efeitos mediados pelo receptor em humanos



**TLR:** receptores semelhantes a "toll", **TIR:** domínio tirosina, **MyD88:** molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88, **NF-κB:** fator de transcrição nuclear kappa B, **TRIF:** proteína adaptadora de domínio TIR indutora de IFN, **IRFs:** fatores de regulação de interferon, **AP1:** Activated protein 1, **IKK:** Inhibitor of κB-kinase, **IRAK:** IL-1 receptor associated kinase, **I-κB:** Inhibitor of κB, **JNK:** c-Jun N-terminal Kinase, **MKK:** MAP (mitogen activated protein) kinase kinase, **RIP 1:** Receptor-interacting protein 1, **TAB:** TAK1-binding protein, **TAK-1:** Transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase 1, **TBK:** TANK-binding kinase, **TIRAP:** TIR domain-containing adaptor protein, **TRAM:** TRIF-related adaptor molecule.

**Fonte:** ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016 (adaptado).

Em seres humanos, os TLRs são classificados numericamente (TLR-1 a TLR-10) e são, particularmente, responsáveis pelo reconhecimento de moléculas específicas, de acordo com a sua especificidade. Todavia, os TLR são geralmente encontrados na forma de homodímeros (mesmo receptor dimerizado) ou heterodímeros (diferentes TLR que sofreram dimerização) que também participam de maneira bastante importante no reconhecimento de antígenos microbianos. Por exemplo, o peptidoglicano é reconhecido por um heterodímero formado por TLR-2 e TLR-6 (AKIRA; TAKEDA, 2004; ALBIGER et al., 2007; BEHZADI; BEHZADI, 2016).

Entre os principais ligantes dos TLRs estão os lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano, flagelina, RNA dupla-fita, ácido lipoteicoico, proteínas virais e motivos CpG DNA não-metilado que ativam diferentes TLRs em mamíferos, desencadeando uma resposta imunológica inata (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; KAWAI; AKIRA, 2010; SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

Os TLRs estão localizados na membrana ou interior da célula e todos possuem um domínio citoplasmático denominado “domínio TIR”. Essas porções citoplasmáticas são fundamentais para a consequente sinalização intracelular iniciada após o reconhecimento dos PAMPs. A sinalização é, geralmente mediada por proteínas adaptadoras (exemplos: MyD88 e TRIF) recrutadas após a ativação e dimerização do TLR. Essas proteínas adaptadoras auxiliam na ativação de diversas proteínas cinases que, por conseguinte, causam ativação dos fatores de transcrição nucleares como o NF- $\kappa$ B, AP-1 e IRFs, responsáveis pela expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias que participam na imunidade inata e adaptativa (figura 6) (MEYLAN; TSCHOPP; KARIN, 2006; GOLDMAN, 2007; PARKER; PRINCE; SABROE, 2007; HENNESSY; PARKER; O'NEILL, 2010).

### 1.7 RECEPTORES SEMELHANTES A *TOLL* (TLRs) E A SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO POR *Leishmania* EM HUMANOS

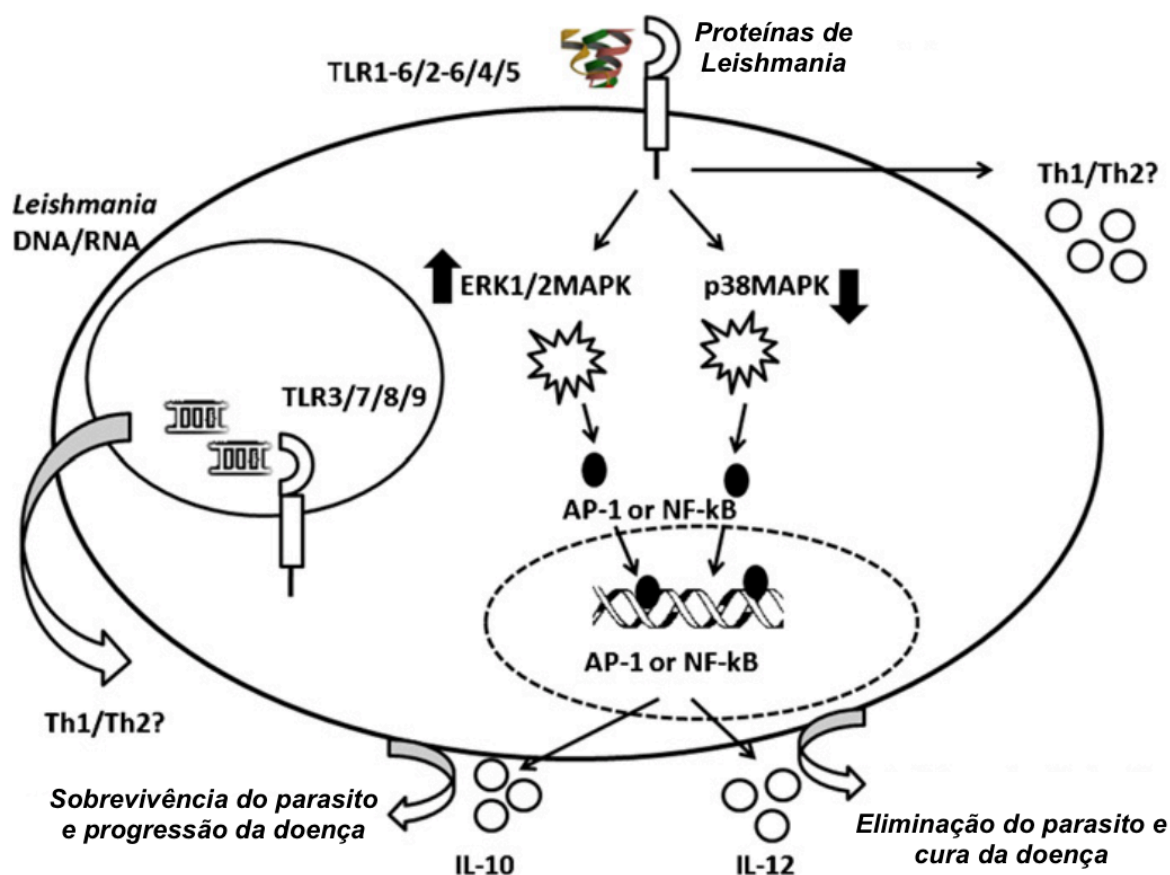
Os TLR-2 de macrófagos e células NK possuem a capacidade de reconhecer a lipofosfoglicana (LPG) de parasitas do gênero *Leishmania*. O reconhecimento desses padrões moleculares induz o desencadeamento de uma resposta imune mediada pelos linfócitos T *helper* 1 (Th1) fundamental para o controle da infecção pelo parasita, uma vez que, induz a produção de espécies



reativas de oxigênio e nitrogênio, levando à morte do *Leishmania*. Além disso, a LPG induz aumento da produção de TNF-alfa e da expressão do TLR-2 em macrófagos e de IFN-gama pelos linfócitos (VEER; CURTIS; BALDWIN, 2003; BECKER et al., 2003; WATTS; WEST; ZARU, 2010).

*L. donovani* foi capaz de diminuir a produção de IL-12 em macrófagos devido a diminuição da expressão do TLR-2 (BHATTACHARYA et al., 2010). Em outro estudo, foi observado um aumento na expressão do TLR-2 em células da pele de pacientes com Leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*, apesar de não ter havido uma correlação direta com a expressão de citocinas (TUON et al., 2012).

**Figura 7.** Representação da possível modulação dos TLR pela interação com o *Leishmania*



**Fonte:** SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012.

O TLR-3 também parece desempenhar um papel importante na defesa do macrófago contra o parasita, uma vez que, há um aumento da expressão desse receptor em células produtoras de IFN- $\gamma$  após ativação pelo material genético do

parasito (figura 7). A infecção por *Leishmania donovani* causa um silenciamento do gene responsável pela expressão do TLR-3 e assim, diminui a produção de óxido nítrico e TNF-alfa pelos macrófagos, auxiliando o parasita no escape da resposta imune (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006).

O TLR-4 é motivo de controvérsia em relação ao seu papel na Leishmaniose, pois não são conhecidos possíveis ligantes desse receptor em parasitas do gênero *Leishmania*. Foi demonstrado que a inibição desse receptor induziu aumento no número de lesões utilizando modelos animais infectados com *L. major*. Isso estaria relacionado com um eficiente controle da infecção pelo aumento da atividade da iNOS (óxido nítrico sintase induzível). Contudo, não foi observado aumento na expressão de TLR-4 em macrófagos na pele de pacientes infectados por *L. braziliensis* (KROPF et al., 2004; TUON, 2011).

Os TLR-2 e -4 possuem um importante papel no desenvolvimento da Leishmaniose causada por *L. chagasi* e *L. braziliensis*. O TLR-9 é responsável por reconhecer fragmentos de DNA provenientes do parasito e esse reconhecimento incrementa a produção de IL-12, elevando a secreção de IFN-gama pelas células T. O papel desses receptores tem sido amplamente estudado, porém, ainda não se dispõe de estudos com os TLR-7 e -8 (VARGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2009; CEZARIO et al., 2011; TUON et al., 2012; DASGUPTA; AGHAZADEH-DIBAVAR; BANDYOPADYAY, 2014).

Entre os possíveis agonistas para esses receptores, temos o LPS, uma endotoxina de bactéria *E. coli* (cepa 0111:B4), principal ligante do TLR-4 e o Pam3CSK4, um lipopeptídeo sintético agonista de TLR-1 e TLR-2. Estes ligantes, podem, potencialmente, exercer um papel importante na defesa do hospedeiro contra o parasita, uma vez que, desencadeiam uma resposta inflamatória com aumento de TNF-alfa e NO. O CL075 é uma molécula agonista do TLR-8 que induz a expressão de TNF-alfa e IL-12 mediada pela proteína adaptadora MyD88 e do TLR-7, a partir do qual, parece promover aumento da secreção de IFN- $\gamma$  (ALIPRANTIS et al., 1999; CAMPOS et al., 2001; FARINA, et al., 2004; GORDEN et al., 2005; HAN et al., 2014).

Os mecanismos de regulação da resposta imunológica constituem um dos principais alvos atualmente estudados em busca do desenvolvimento de possíveis vacinas ou tratamento mais eficazes que possam incrementar a resposta do hospedeiro contra o *Leishmania*, desencadeando menos efeitos adversos do que os

encontrados nos tratamentos atuais (HERWALDT, 1999; BRASIL, 2007; MEARS et al., 2015; SCOTT; NOVAIS, 2016).

O tratamento atual das Leishmanioses se baseia no uso de drogas antimoniais pentavalentes e derivadas. Essas drogas interferem no metabolismo energético do parasita, causando alteração em processos bioenergéticos como a glicólise e a oxidação de ácidos graxos, levando a uma diminuição na oferta intracelular de ATP e GTP. Assim, esses fármacos apresentam atividade Leishmanicida. Uma vez que, os atuais tratamentos realizados com Glucantime®, Pentamidina e Anfotericina B costumam produzir diversos efeitos adversos e resistência parasitária com o uso prolongado, dificultando a adesão ao tratamento, é fundamental, que se explore novas estratégias terapêuticas para o controle da infecção por *Leishmania*, inclusive com o auxílio do sistema imunológico do hospedeiro, para que uma resposta imunológica mais eficiente possa combater o parasita (LIMA et al., 2007; SINGH; GARG; ALI, 2016; CHEUKA et al., 2016).

Como citado anteriormente, diversos estudos têm mostrado a importância e a participação dos receptores semelhantes a *toll* na infecção por parasitas do gênero *Leishmania*. A estimulação desses receptores pode desencadear uma resposta imunológica mediada por linfócitos T helper 1 (figura 6) e assim, auxiliar no controle da infecção pelo parasita mediado pelos macrófagos. Assim, o uso de ligantes agonistas dos TLR, poderiam estimular os macrófagos infectados com o parasita em prol de uma reação imune mais eficiente para a eliminação do patógeno (FARINA, et al., 2004; TUON et al., 2008).

Estudos recentes, têm demonstrado resultados promissores acerca do desenvolvimento de vacinas eficazes contra o *Leishmania*. Entre as estratégias mais utilizadas estão o uso de proteínas ancoradas por GPI, gp63, lipofosfoglicana e também de adjuvantes como oligonucleotídeos CpG e diversas proteínas recombinantes. O uso de nanopartículas como moléculas auxiliaadoras também têm sido bastante estudado. Além disso, estudos mostram a importância da sinalização mediada pelos TLR como promissora no desenvolvimento de vacinas, principalmente, com o potencial adjuvante de alguns ligantes de TLR (SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012; BADIEE et al., 2013; KHAMESIPOUR, 2014; BAGIROVA et al., 2016; DE LUCA; MACEDO, 2016; DUARTE et al., 2016; SUNDAR; SINGH, 2016; ISLAN et al., 2017).

## 2 OBJETIVOS

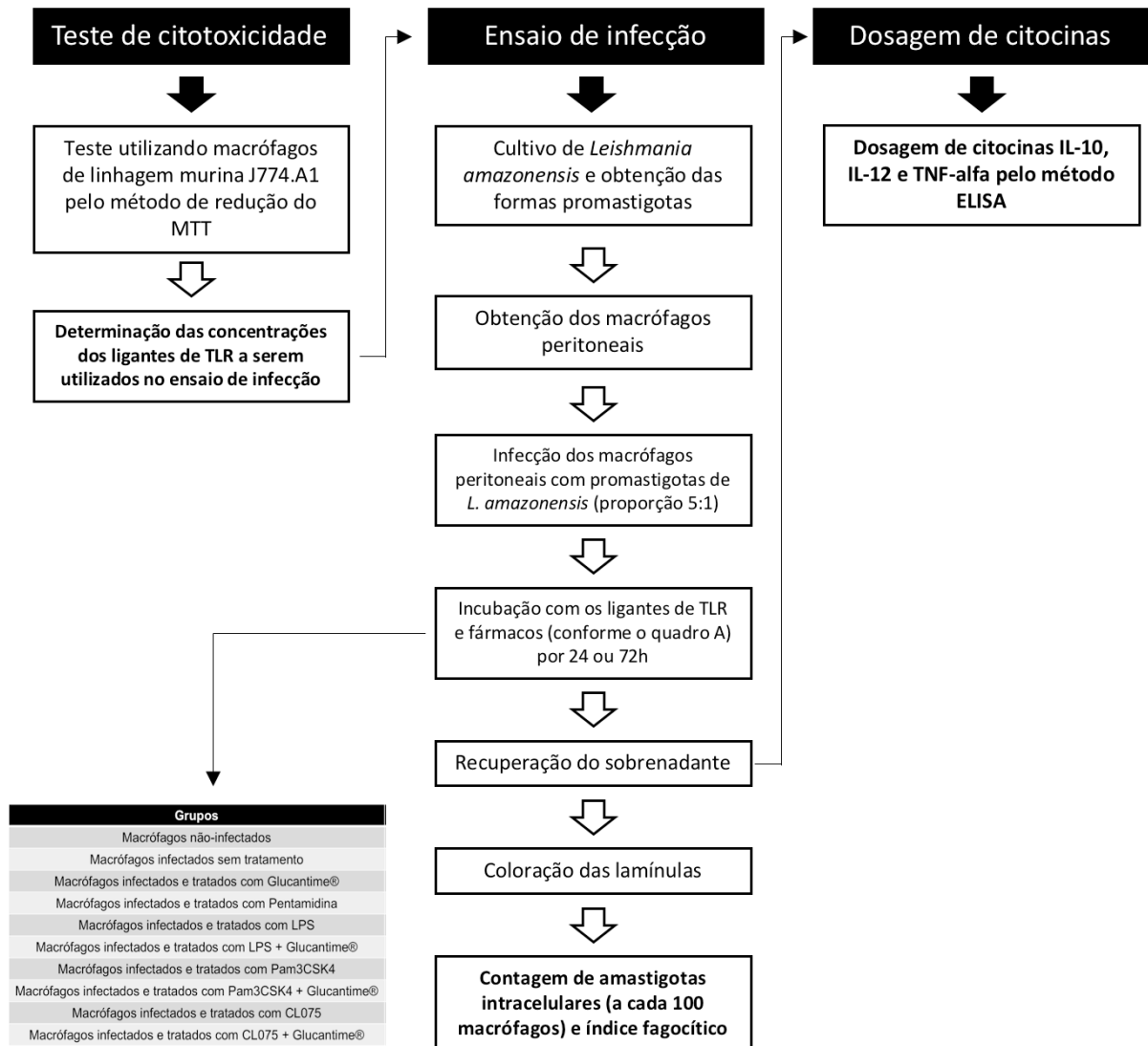
### 2.1 GERAL

Avaliar o efeito coadjuvante dos receptores semelhantes a *toll* (TLR) na estimulação de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis* com agonistas de TLR: LPS, Pam3CSK4 e CL075.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o grau de citotoxicidade dos ligantes de TLR: LPS, Pam3CSK4 e CL075 em macrófagos de linhagem J774.A1.1 com ou sem Glucantime®;
- Avaliar o índice fagocítico e quantificar o número de amastigotas em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e estimulados com agonistas de TLR: LPS, Pam3CSK4 e CL075 com ou sem Glucantime®;
- Realizar a dosagem de citocinas inflamatórias (TNF-alfa e IL-12) ou anti-inflamatória (IL-10) em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e estimulados com agonistas de TLR: LPS, Pam3CSK4 e CL075 com ou sem Glucantime®.

## FLUXO EXPERIMENTAL



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, 8-10 semanas de idade, pesando de 20-28g, obtidos do Biotério da FIOCRUZ/RO. Os animais foram mantidos em condições padronizadas do biotério. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ/RO mediante aprovação do projeto de pesquisa sob o Certificado de Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ RO (protocolo 2013/10).

#### 3.2 PARASITAS

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 obtidas da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC/FIOCRUZ). As culturas foram mantidas a partir de camundongos BALB/c, previamente inoculados com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*, pela via subcutânea, na pata traseira direita. Depois de dois meses de infecção, os animais foram então, eutanasiados e as patas contendo a lesão foram removidas e a pele necrosada retirada, em condições estéreis. Em seguida, as patas foram maceradas em meio RPMI liberando as formas amastigotas de *L. amazonensis*. O material obtido da maceração foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o *pellet* ressuspensionado em meio RPMI/SFB (RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino). Essa cultura foi então mantida a 24°C em estufa incubadora B.O.D. para a transformação das amastigotas em promastigotas. Para a propagação *in vitro* destas formas promastigotas, uma alíquota de parasitas, em fase estacionária de crescimento, foi diluída em eritrosina B 0,04% e contada em câmara de Neubauer espelhada, em microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitas corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de parasitas} = n^{\circ} \text{ de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

Após a realização dos cálculos  $5 \times 10^5$  promastigotas/mL foram colocadas em meio RPMI/SFB. Os parasitas foram então mantidos a 24°C e subcultivados, a cada cinco dias, por sucessivas passagens, até um máximo de 12 passagens.

### 3.3 CULTIVO DE CÉLULAS J774.A1

Macrófagos murinos J774.A1 foram mantidos em garrafas plásticas de cultura em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum, Gibco TM, Invitrogen, Brazil). O RPMI 1640 foi preparado, reconstituindo-se o pó em 1 litro de água destilada, adicionando 20 mM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico; GIBCO BRL) e 50 µg/mL de gentamicina. Depois de preparado, o meio RPMI 1640 foi esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm (Millipore). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. As células foram removidas das garrafas utilizando *cell scraper* e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer após diluição em azul de tripan.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio), como descrito por Reilly e colaboradores (1998). Neste método, o MTT é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO (REILLY; BELLEVUE; WOSTER, 1998).

Os macrófagos de linhagem J774.A1 foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  células/poço) em placas de 96 poços. Após 24 horas foram adicionados os ligantes de TLR: LPS (a partir de 100 ng/mL), Pam3CSK4 (a partir de 100 ng/mL) e CL075 (a partir de 200 ng/mL) com e sem o tratamento utilizado para infecção pelo parasita (Glucantime® a partir de 1000 µg/mL), bem como os controles negativo e positivo. Foi realizada diluição seriada a partir das concentrações descritas anteriormente, diminuindo pela metade a concentração em cada poço posterior. Após 72h horas de incubação, foram adicionados 20 µL de solução de MTT (5mg/mL). Após 4 horas de incubação a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100µl de DMSO.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa a 540nm. Para o cálculo de morte celular foi utilizada a seguinte fórmula (VICHAI; KIRTIKARA, 2006):

$$\% \text{ células mortas} = 100 - \frac{\text{D.O. teste}}{\text{D.O. controle}} \times 100$$

### 3.5 OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos BALB/c sofreram inoculação, por via intraperitoneal, com 3 mL de Tioglicolato 3% (GORDON; UNKELESS; COHN, 1974). Após 4 dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e 5 mL de meio RPMI gelado foram injetados na cavidade peritoneal e em seguida recuperados com a própria seringa. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1000rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 5 mL de meio RPMI e as células obtidas, contadas em câmara de Neubauer. Os macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e plaqueados em placa de 24 poços (5x10<sup>5</sup> células/poço) e incubados a 37°C em incubadora com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (incubadora modelo RCO3000TVBB, REVCO Technologies, Asheville, USA).

### 3.6 INFECÇÃO E TRATAMENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS *in vitro*

Para avaliação da atividade anti-leishmania coadjuvante dos ligantes de TLR: TLR-4: LPS (HAN et al., 2014), TLR-2: Pam3CSK4 (OZINSKY et al., 2000) e TLR-7 e -8: CL075 (GORDEN et al., 2005) obtidos da Invivogen com ou sem Glucantime®, foram realizados ensaios de infecção dos macrófagos peritoneais, obtidos conforme item 3.3. Os ensaios de infecção foram realizados conforme descrito por Silva-Jardim e colaboradores (2004). Após 24 horas de incubação, os macrófagos foram lavados duas vezes com meio RPMI e, em seguida, infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5:1 (5 parasitos para cada macrófago).

As células infectadas foram incubadas *overnight* a 34°C em estufa com atmosfera úmida contendo a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período os poços foram



novamente lavados com meio RPMI e incubados com ligantes de TLR (LPS 25 ng/mL, Pam3CSK4 25 ng/mL e CL075 50 ng/mL associados ou não ao Glucantime® 250 µg/mL) e com Pentamidina 5µg/mL ou Glucantime® 250 µg/mL em um volume final de 500 µl/poço.

**Quadro 1.** Grupos do ensaio de infecção e tratamento de macrófagos peritoneais

Grupos	Abrev.	Tempo
Macrófagos não-infectados	MØ	24h e 72h
Macrófagos infectados sem tratamento	S/Trat (C-)	
Macrófagos infectados e tratados com Glucantime®	GLUC	
Macrófagos infectados e tratados com Pentamidina	PENTA	
Macrófagos infectados e tratados com LPS	LPS	
Macrófagos infectados e tratados com LPS + Glucantime®	GLUC + LPS	
Macrófagos infectados e tratados com Pam3CSK4	Pam3CSK4	
Macrófagos infectados e tratados com Pam3CSK4 + Glucantime®	GLUC + Pam3CSK4	
Macrófagos infectados e tratados com CL075	CL075	
Macrófagos infectados e tratados com CL075 + Glucantime®	GLUC + CL075	

A Pentamidina e o Glucantime® foram utilizados como drogas de referência (controle positivo). Foram utilizadas células infectadas não tratadas como controle negativo. As culturas infectadas e tratadas foram mantidas por 24 ou 72 horas a 34°C. Após esses períodos, o sobrenadante das culturas foi coletado e congelado para posterior dosagem de citocinas. A taxa de infecção e o número de parasitas intracelulares foram avaliados pela contagem de 100 macrófagos, em microscópio óptico - aumento de 1000X, após coloração das lâminas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG) (modificado de GIAIMIS et al., 1992). Resumidamente, as células foram lavadas com RPMI sem suplemento e imobilizadas com soro fetal bovino até a lamínula secar naturalmente em temperatura ambiente. Depois de secas, o corante May Grünwald foi adicionado sobre as lamínulas por 1 minuto e, em seguida, adicionado água destilada por 1 minuto. Removeu-se a solução corante/água e foi acrescentado o corante Giemsa por 2 minutos.

Finalmente a lamínula foi lavada rapidamente com água destilada e, depois de seca, montada com bálsamo sobre uma lâmina de vidro. O ensaio de infecção e fagocitose foi realizado em dois experimentos independentes (cada um realizado em triplicata). A taxa de infecção foi determinada pela porcentagem de macrófagos

infectados. Foram realizados dois experimentos independentes, cada um em triplicata.

Além disso, foi determinado o índice fagocítico através do número de parasitas no interior de cada macrófago infectado. O cálculo foi feito utilizando-se a fórmula a seguir (BARBIERI et al., 1993):

$$\text{Índice fagocítico: } \% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{número médio de parasitos por macrófago}$$

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS MACRÓFAGOS

As citocinas TNF-alfa, IL-10 e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes do experimento descrito na seção 3.6. Para cada citocina, a dosagem foi realizada através do teste imunoenzimático de captura - ELISA. Para isso foi utilizado o Kit OptEIA™ Set (BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em tampão 0.1M Carbonato de sódio pH 9,5 e as placas incubadas “overnight” à 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (ProClin™-150) e bloqueadas com BSA a 1% em tampão de ensaio padronizado do Kit (ProClin™-150) à temperatura ambiente por 1h. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (ProClin™-150). Após a última lavagem foram adicionados em cada poço 100 µL do padrão da citocina ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados (amostras). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2h, e lavadas cinco vezes. Em seguida, foi adicionado o anticorpo monoclonal de detecção (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de reagente (ProClin™-150). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1h e lavadas cinco vezes, sendo então adicionados 100 µL/poço do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1:250 em diluente do Kit e incubadas novamente à temperatura ambiente por 30 min. Após este período de incubação as placas foram lavadas sete vezes e em seguida foram adicionados 100 µL da solução substrato (peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5' tetrametilbenzidina – TMB em solvente orgânico) em cada poço e incubadas

por 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido fosfórico 1M em cada poço. Para verificar a absorbância foi utilizado comprimento de onda de 450nm (com correção em 570nm) em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems) e as concentrações de cada citocina foram determinadas utilizando-se a curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

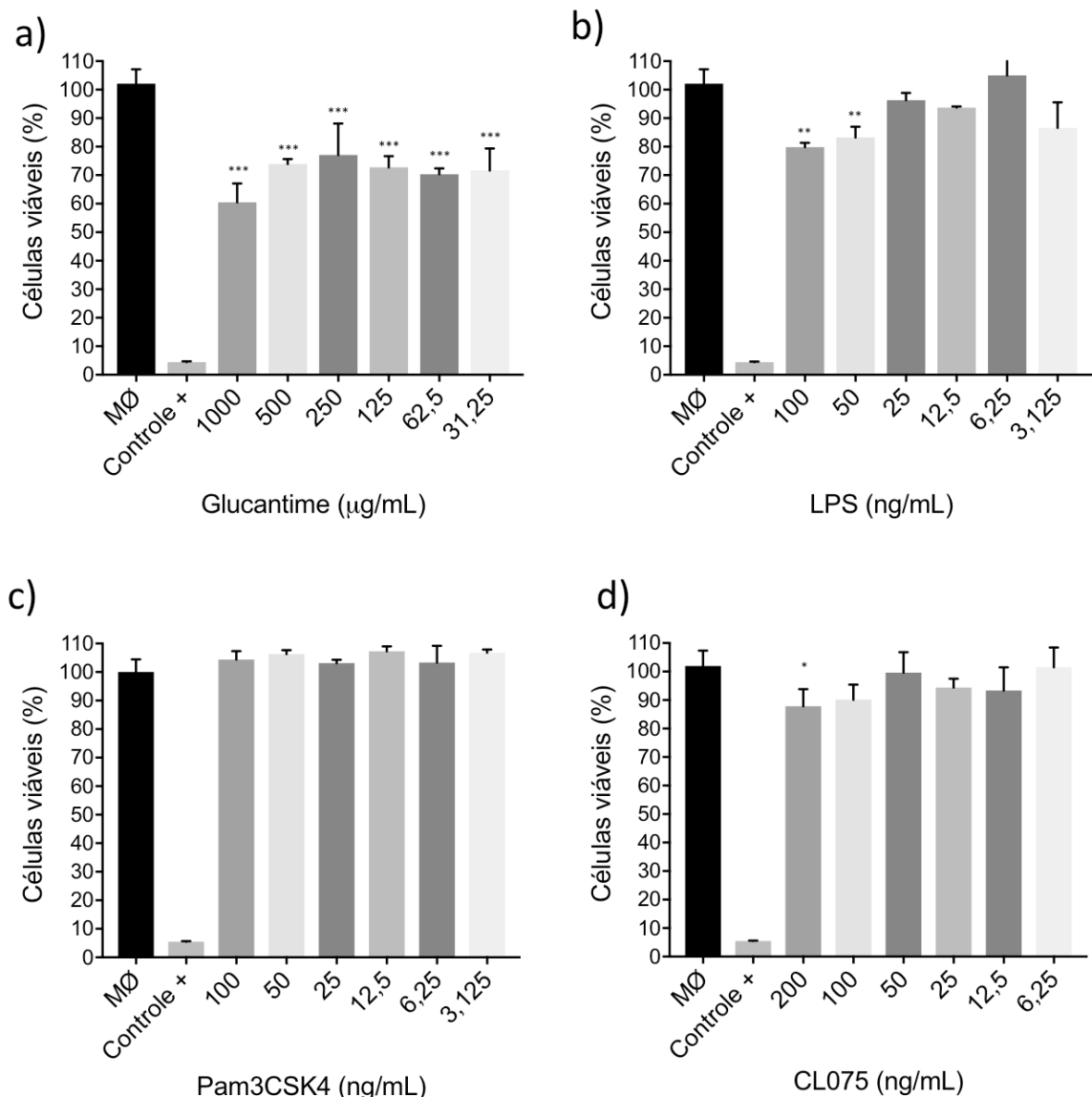
A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad Prism versão 7 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para  $p < 0,05$  através de comparações múltiplas ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Foram realizados dois experimentos independentes, ambos realizados em triplicata.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade dos ligantes de TLR utilizados foi testada pelo método MTT em macrófagos J774.A1 incubados por 72h com Glucantime® e com os ligantes (LPS, Pam3CSK4 ou CL075) isolados (figura 8) ou associados ao Glucantime® (figura 9) e a porcentagem de células mortas foi calculada conforme descrito na seção 3.4.

**Figura 8.** Teste de citotoxicidade dos ligantes de TLR-2, 4, 7 e 8 (LPS, Pam3CSK4 e CL075) em macrófagos J774.A1



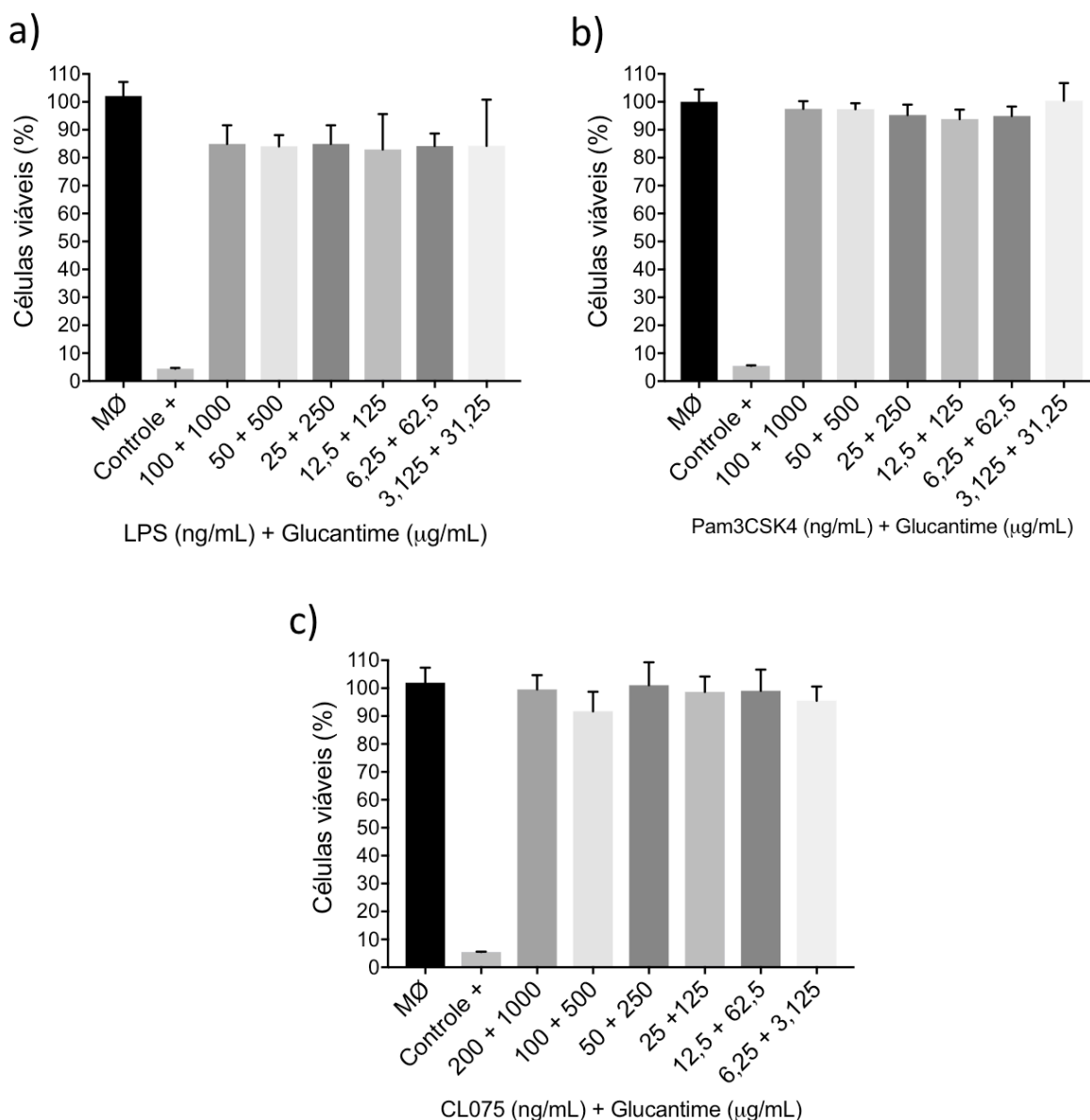
Macrófagos da linhagem J774.A1 foram incubados por 72h com os ligantes de TLR (LPS, Pam3CSK4 ou CL075) ou Glucantime® em diferentes concentrações. MØ foram utilizados como controle negativo (sem adição de substâncias) e no Controle positivo foi adicionado tampão de lise (controle de morte).

As diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle de MØ estão representadas pelos símbolos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata.

O Glucantime® apresentou uma toxicidade significativa nas diferentes concentrações (31,25  $\mu\text{g/mL}$  a 1.000  $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparado ao controle negativo, causando a morte entre 23,01% e 39,5% das células (figura 8a). Para o LPS, a porcentagem de morte variou significativamente entre as concentrações testadas. As concentrações que apresentaram maior toxicidade foram 100 ng/mL e 50 ng/mL (20,1% e 16,7% de morte das células, respectivamente). Essas duas concentrações apresentaram diferença significativa na porcentagem de morte celular quando comparadas ao controle negativo (figura 8b).

O Pam3CSK4 e o CL075 não apresentaram toxicidade significativa nas concentrações testadas (Pam3CSK4: 3,125 ng/mL a 100 ng/mL e CL075: 6,25 ng/mL a 100 ng/mL) quando comparados ao controle negativo. A exceção foi a utilização de 200ng/mL do CL075 que provocou 12,18% de morte nas células (figura 8c e 8d).

**Figura 9.** Teste de citotoxicidade dos ligantes de TLR-2, 4, 7 e 8 (LPS, Pam3CSK4 e CL075) + Glucantime® em macrófagos J774.A1



MØ foram utilizados como controle negativo (sem adição de substâncias) e no Controle positivo foi adicionado tampão de lise (controle de morte). Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata.

Quando associados ao Glucantime®, diferentemente do perfil observado anteriormente (sem a associação) nenhuma das concentrações apresentou toxicidade significativa quando comparadas ao controle (figuras 9a, 9b e 9c).

Os resultados foram utilizados para a determinação das concentrações dos ligantes e do Glucantime® a serem utilizados no ensaio de infecção para avaliar o crescimento/sobrevivência dos parasitas em macrófagos peritoneais, bem como, o índice fagocítico. As concentrações selecionadas foram as seguintes: Glucantime®:

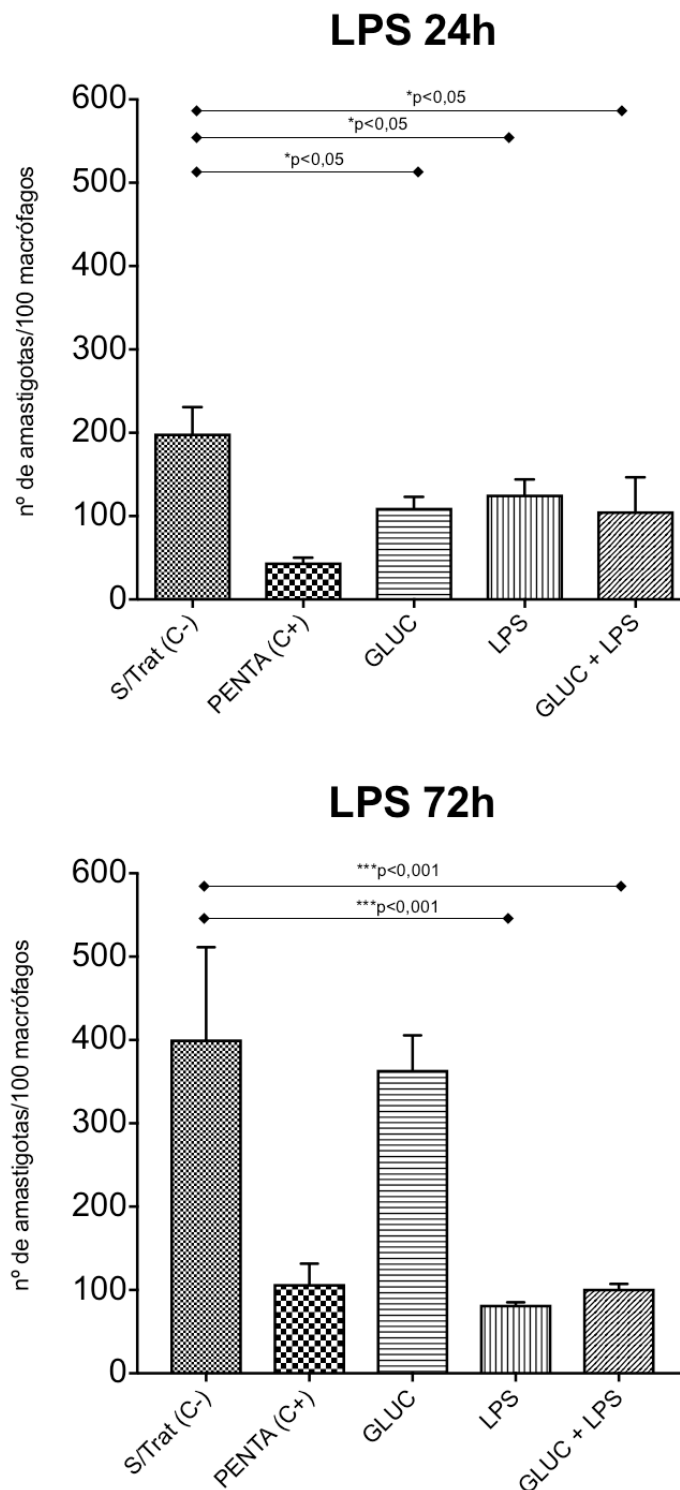
250 µg/mL, LPS: 25 ng/mL, Pam3CSK4: 25 ng/mL e CL075: 50 ng/mL, tanto para os ligantes isolados ou em associação ao Glucantime®.

#### 4.2 ENSAIO DE FAGOCITOSE

Na contagem após 24h de incubação, o LPS ( $126 \pm 18$ ) diminuiu significativamente o número de amastigotas quando comparado com o Controle sem tratamento ( $199 \pm 31,5$ ). Em associação ao Glucantime® foi observado um número inferior ( $106 \pm 40,73$ ) e quando utilizado somente o Glucantime® ( $110 \pm 13,08$ ), também houve uma diminuição comparado com o controle ( $p < 0,05$ ). O LPS e LPS associado ao Glucantime® não apresentaram diferença significativa em comparação ao Glucantime® isoladamente após 24 ou 72h (figura 10).

O LPS diminuiu consideravelmente o número de amastigotas do parasito após 72h de infecção quando comparado com o controle sem tratamento (LPS  $82,33 \pm 1,66$  vs. Controle negativo  $400,7 \pm 63,84$ ,  $p < 0,001$ , indicado pelo \*\*\*). Quando utilizado juntamente com o Glucantime®, também foi observada uma diminuição na sobrevivência do parasita em relação ao controle (LPS + Gluc  $101,7 \pm 3,18$  vs. Controle negativo  $400,7 \pm 63,84$ ,  $p < 0,001$ , indicado pelo \*\*\*). Os macrófagos tratados somente com Glucantime® não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

**Figura 10.** Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com LPS.



Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 72h com o LPS (25 ng/mL), Pentamidina (5µg/mL) ou Glucantime (250 µg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas estão representadas pelos símbolos (\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

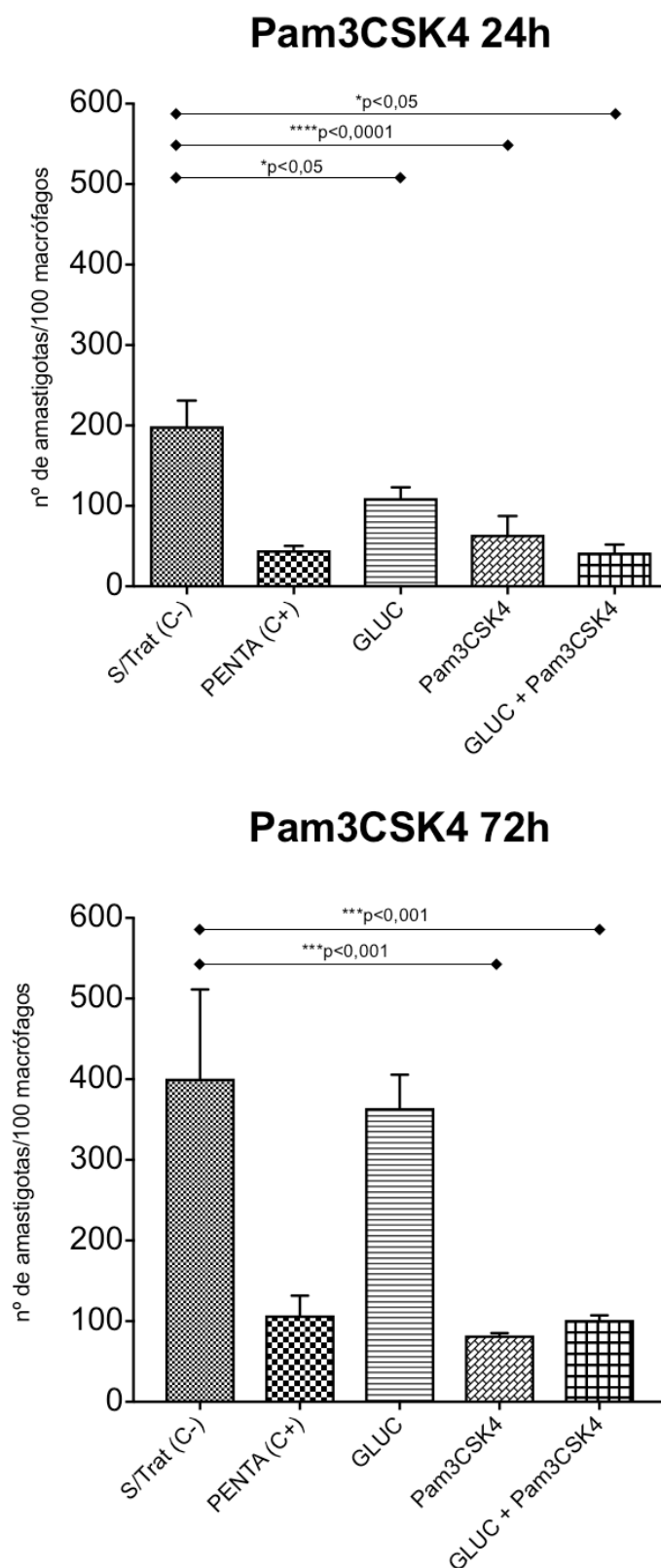


Após 24h de incubação, o Pam3CSK4 ( $64,33 \pm 23,03$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) e a associação Glucantime® + Pam3CSK4 ( $42 \pm 10,15$ , \* $p < 0,05$ ) causaram diminuição no número de amastigotas quando comparado ao controle negativo ( $199 \pm 31,5$ ) (figura 11). Um perfil semelhante foi observado após 72h de incubação. O Pam3CSK4 também diminuiu o crescimento do parasita quando comparado com o controle sem tratamento (Pam3CSK4  $100,7 \pm 23,14$  vs. Controle negativo  $400,7 \pm 63,84$ , \*\*\* $p < 0,001$ ), bem como na associação ao Glucantime® ( $105,7 \pm 11,29$ ) em relação ao controle negativo (\*\*\* $p < 0,001$ ). Os macrófagos tratados com o Pam3CSK4 e os tratados com GLUC + Pam3CSK4 não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 11).

Foi observado um perfil similar ao LPS e Pam3CSK4 na utilização do CL075 após 24h, uma vez que causou diminuição no número de amastigotas em comparação ao controle negativo (CL075  $75,0 \pm 27,0$  vs. Controle negativo  $199 \pm 31,5$ , \*\*\* $p < 0,001$ ), assim como o que pode ser visualizado na associação ao Glucantime® ( $61,33 \pm 19,94$ ) comparado ao controle negativo (\*\*\* $p < 0,001$ ) (figura 12).

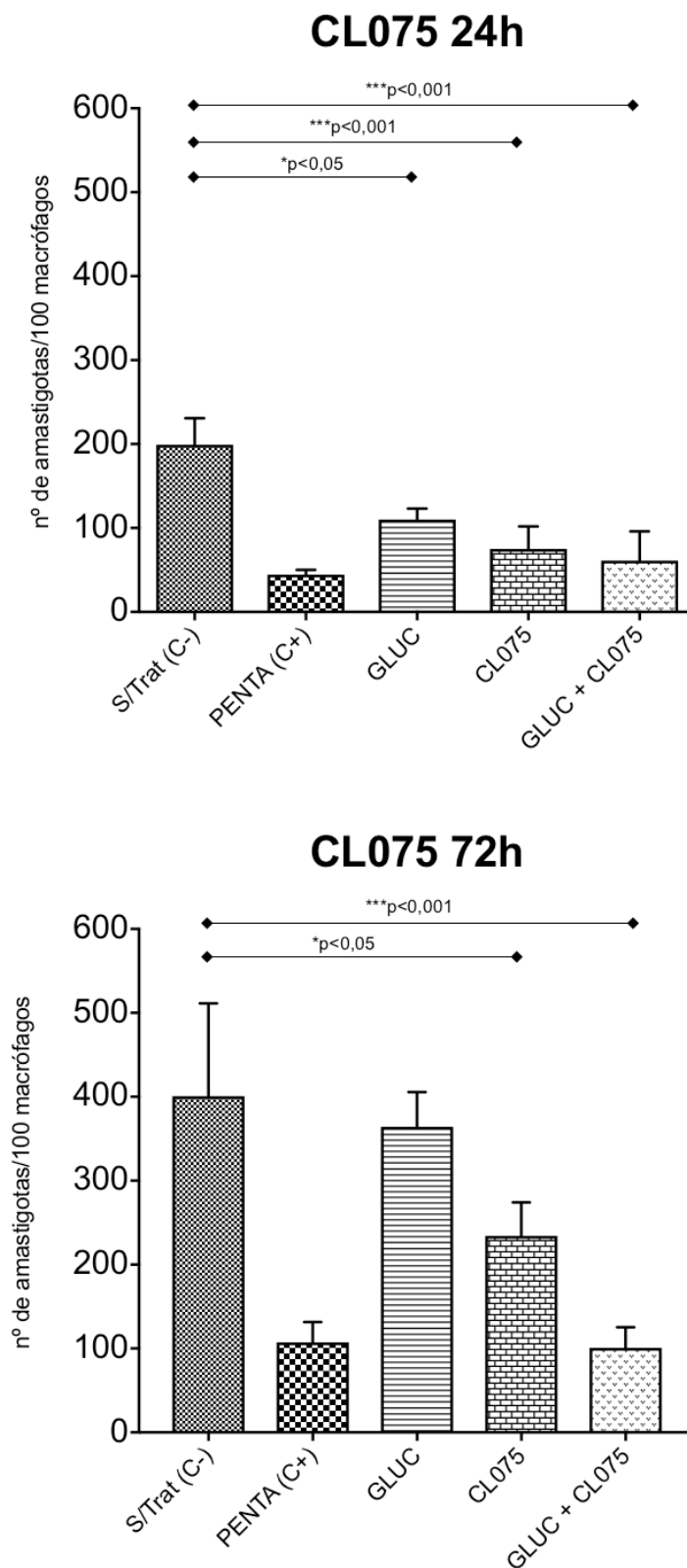
Após 72h o CL075 diminuiu significativamente o número de amastigotas (CL075  $234,0 \pm 22,9$  vs. Controle negativo  $400,7 \pm 63,84$ , \* $p < 0,05$ ). Quando utilizado juntamente com o Glucantime®, também foi observada uma diminuição na sobrevivência do parasita em relação ao controle ( $100,7 \pm 14,31$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) (figura 12).

**Figura 11.** Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com Pam3CSK4.



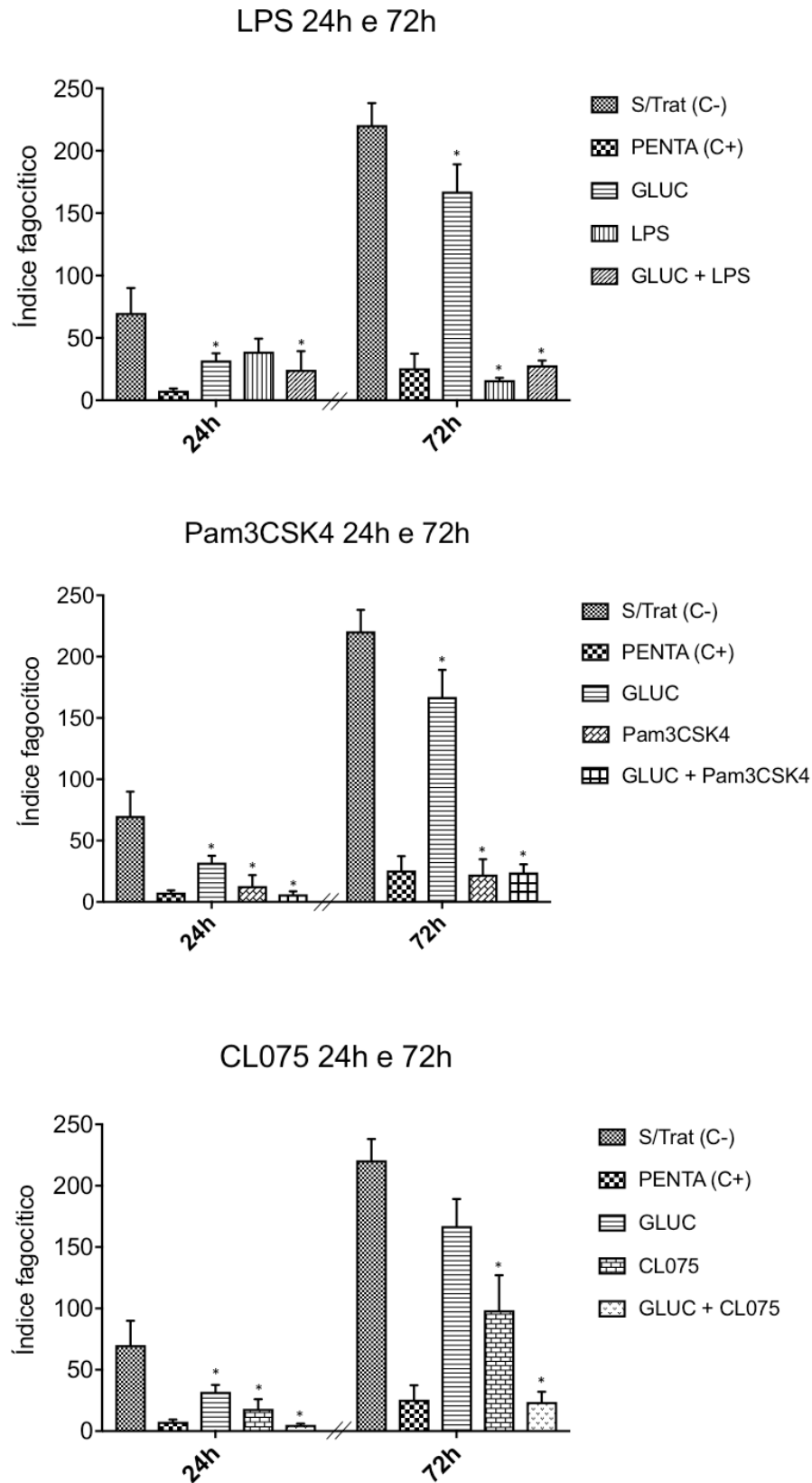
Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 72h com o Pam3CSK4 (25 ng/mL), Pentamidina (5µg/mL) ou Glucantime (250 µg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo símbolo (\*).

**Figura 12.** Contagem das formas amastigotas em macrófagos 24h e 72h após a infecção e incubação com CL075.



Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 72h com o CL075 (50 ng/mL), Pentamidina (5µg/mL) ou Glucantime (250 µg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas pelo símbolo (\*).

**Figura 13.** Análise do índice fagocítico em macrófagos infectados (tratados e não-tratados) 24h e 72h após a infecção.



Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 24 ou 72h com o LPS (25ng/mL), Pam3CSK4 (25ng/mL), CL075 (50 ng/mL), Pentamidina (5µg/mL) ou Glucantime (250 µg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes

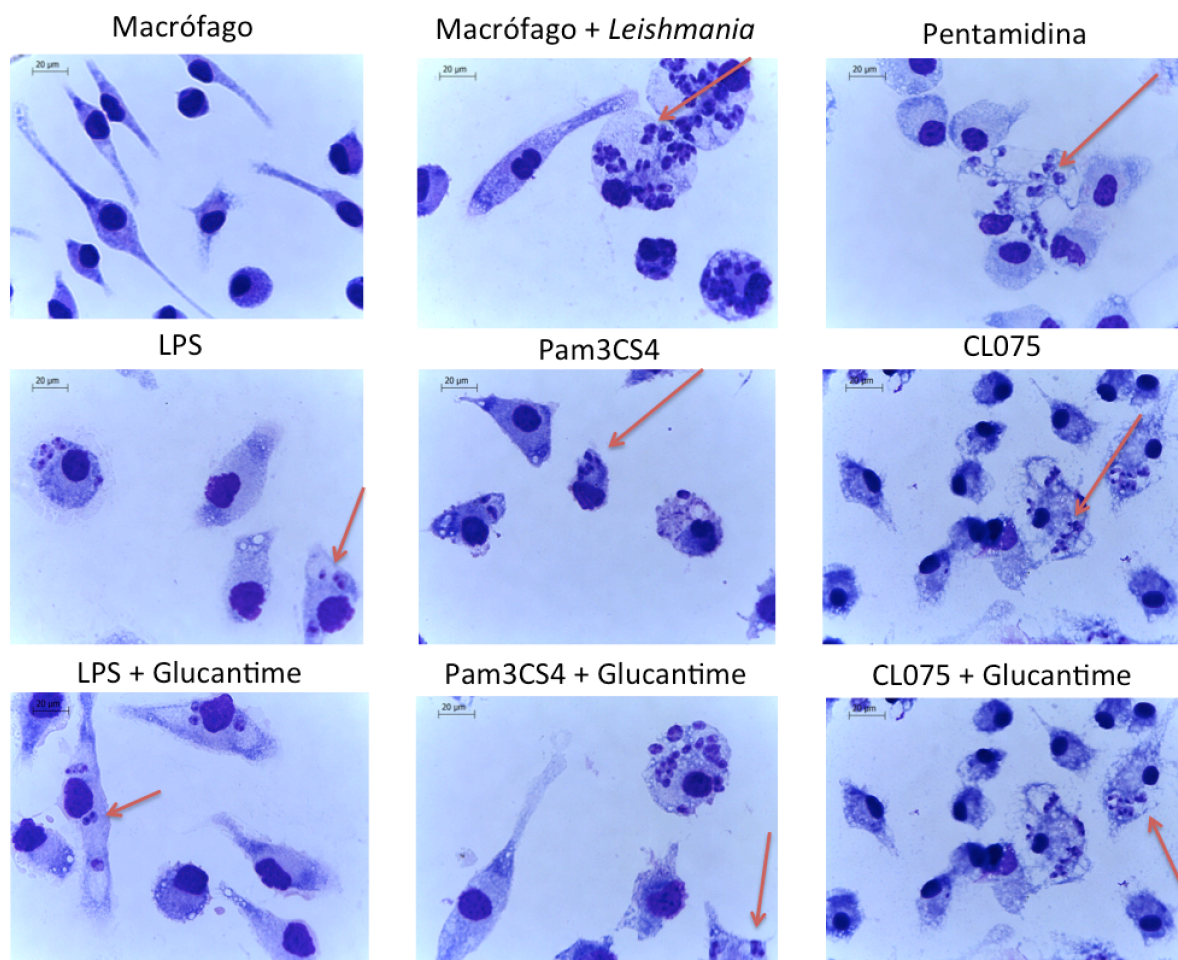
realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o Controle sem tratamento (C-) estão representadas pelo símbolo (\*).

O índice fagocítico foi calculado utilizando a fórmula descrita na seção 3.6 para verificar a fagocitose dos amastigotas de *Leishmania*. Após 24h de incubação, o Glucantime® ( $32,05 \pm 5,56$ ), Glucantime® + LPS ( $24,53 \pm 14,88$ ), Pam3CSK4 ( $13,02 \pm 8,93$ ), Glucantime® + Pam3CSK4 ( $6,27 \pm 2,38$ ), CL075 ( $18,19 \pm 7,8$ ) e Glucantime® + CL075 ( $5,20 \pm 0,91$ ) diminuíram o índice fagocítico quando comparados ao controle sem tratamento ( $70,16 \pm 19,85$ ). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram representadas pelo (\*) (figura 13).

Um perfil semelhante foi observado após 72h de incubação. O Glucantime® ( $167,3 \pm 21,89$ ), LPS ( $16,14 \pm 1,95$ ), Glucantime® + LPS ( $28,19 \pm 3,64$ ), Pam3CSK4 ( $22,4 \pm 12,47$ ), Glucantime® + Pam3CSK4 ( $24,2 \pm 6,41$ ), CL075 ( $98,59 \pm 28,49$ ) e Glucantime® + CL075 ( $23,89 \pm 8,22$ ) também causaram diminuição no índice fagocítico quando comparados ao controle sem tratamento ( $220,7 \pm 17,43$ ). As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) foram representadas pelo (\*) (figura 13).

Na figura 14, podem ser observadas as formas amastigotas intracelulares após 72h de incubação dos macrófagos com as substâncias listadas acima. Como pode ser observado, tanto o tratamento utilizado como controle (Pentamidina), quanto os incubados com ligantes de TLR isolados ou associados ao Glucantime® apresentaram uma diminuição no número de amastigotas intracelulares quando comparados com o controle (macrófagos + *L. amazonensis*).

**Figura 14.** Macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados com as drogas usuais ou com os ligantes de TLR isolados ou em associação.



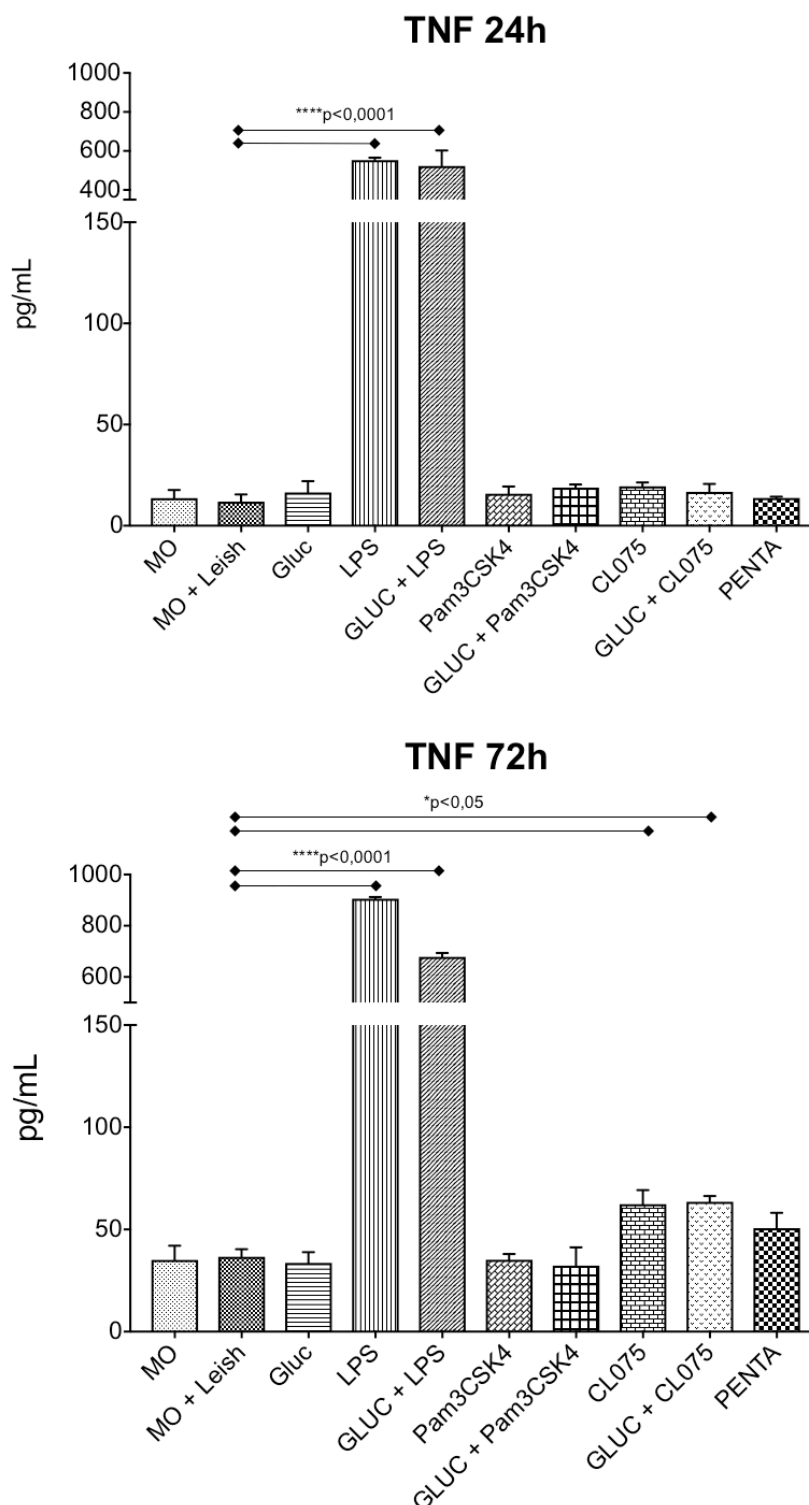
Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 24 ou 72h com o LPS (25ng/mL), Pam3CSK4 (25ng/mL), CL075 (50 ng/mL), Pentamidina (5µg/mL) ou Glucantime (250 µg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As lamínulas foram coradas com May-Grunwald e Giemsa e visualizadas na objetiva de 400X. Os amastigotas intracelulares estão indicados pelas setas.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS MACRÓFAGOS

Foram realizados testes para quantificar no sobrenadante das culturas as citocinas (TNF-alfa, IL-12 e IL-10) produzidas pelos macrófagos (em todos os grupos descritos no quadro 1, seção 3.6) pelo método Imunoenzimático (ELISA). As dosagens de IL-10 e IL-12 não mostraram níveis significativos dessas citocinas no sobrenadante das culturas e a maioria dos valores encontrados estavam abaixo do limite de detecção do kit. Porém, a dosagem de TNF-alfa revelou um aumento significativo da produção desta citocina no sobrenadante das células incubadas com

LPS ( $553,5 \pm 12,02$  pg/mL) e Glucantime®+LPS ( $522,8 \pm 79,8$  pg/mL) após 24h quando comparados com o controle sem tratamento ( $11,91 \pm 3,58$  pg/mL, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Após 72h de tratamento houve aumento (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) na produção de TNF-alfa nos grupos tratados com LPS ( $906 \pm 6,55$  pg/mL) quando comparados ao controle ( $36,63 \pm 3,71$  pg/mL). Houve também um aumento discreto com Glucantime®+LPS ( $678,7 \pm 15,04$  pg/mL), CL075 ( $62,37 \pm 6,92$  pg/mL) e Glucantime®+CL075 ( $63,58 \pm 2,8$  pg/mL) comparados com o controle (\* $p < 0,05$ ) (figura 15).

**Figura 15.** Dosagem de TNF-alfa no sobrenadante das células incubadas com os agonistas de TLR: TLR-2, 4, 7 e 8 (LPS, Pam3CSK4 e CL075) associados ou não ao Glucantime® após 24 e 72h



Macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 24 ou 72h com o LPS (25ng/mL), Pam3CSK4 (25ng/mL), CL075 (50 ng/mL), Pentamidina (5μg/mL) ou Glucantime (250 μg/mL). O resultado acima é representativo de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas em comparação ao Controle sem tratamento (MO+Leish) estão representadas pelo símbolo (\*p<0,05 e \*\*\*\*p<0,0001).



## 5 DISCUSSÃO

As Leishmanioses causadas pela espécie *L. amazonensis* ocorrem significativamente no Brasil e, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro pode levar à forma difusa da doença que possui gravidade e impacto considerável. O tratamento atual da Leishmaniose emprega o uso de fármacos como antimoniato de meglumina (Glucantime®), Pentamidina e Anfotericina B. Essas substâncias produzem toxicidade significativa ou geralmente possuem alto custo, dificultando o tratamento da doença. Outro problema comumente associado à falha terapêutica é a inefetividade das drogas utilizadas atualmente, uma vez que, como relatado na literatura, há chance de resistência às drogas disponíveis na prática clínica (MARTINS et al., 2013; CALDEIRA et al., 2015; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

Por isso, optou-se por avaliar a toxicidade do Glucantime®, além dos ligantes de TLR utilizados neste modelo experimental. O Glucantime® apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas (figura 8). Estudos demonstram que concentrações acima de 100ng/mL podem produzir toxicidade em diferentes linhagens celulares. Contudo, a maioria relata citotoxicidade significativa em macrófagos da linhagem J774 apenas a partir de 1.000ng/mL. Essa variação pode se dar devido a diferenças metabólicas celulares, bem como, ao método utilizado para avaliar a citotoxicidade (DZAMITIKA et al., 2006; VILA-NOVA et al., 2011).

O LPS provocou morte de até 20,1% das células (100ng/mL). Diversos estudos mostram uma boa tolerabilidade do LPS em concentrações de até 100ng/mL em células de linhagem J774. Essa concentração é relativamente segura e produz estímulo adequado para grande parte dos modelos experimentais. Porém, para obter uma margem de segurança, de acordo com as condições experimentais a serem aplicadas para os macrófagos murinos peritoneais, optou-se por utilizar a dose que apresentou menor toxicidade e que seria suficiente para produzir o estímulo desejado (25ng/mL) (MOMOTANI et al., 1998; D'AGOSTINO et al., 2001; HAN et al., 2014; KOIKE et al., 2015).

Há uma escassez de estudos que avaliem a citotoxicidade do Pam3CSK4 e CL075. No presente estudo, pode ser observado que esses dois ligantes não produziram toxicidade significativa em macrófagos J774 nas diferentes concentrações testadas (figura 8). Conforme descrito na literatura, concentrações acima de 25ng/mL do Pam3CSK4 possuem a capacidade de estimular de forma

adequada o TLR-2. Supreendentemente, as associações dos ligantes de TLR aos Glucantime® não produziram toxicidade significativa mesmo utilizando as mesmas concentrações anteriores do Glucantime® (figura 9) (OZINSKI et al., 2000; GORDEN et al., 2005; GORSKI et al., 2006).

Os TLR possuem um papel importante na infecção por *Leishmania* pois participam do reconhecimento do parasita, modulando a resposta imunológica subsequente. A ligação dos agonistas a esses receptores desencadeia a ativação de cascatas intracelulares que culminam com a produção de citocinas que contribuem para a cura ou progressão da doença. Assim, o melhor entendimento da participação desses receptores na infecção pelo parasito pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; GALDINO et al., 2016; HALLIDAY et al., 2016; EHRLICH et al., 2017).

Foi avaliado o efeito leishmanicida sobre formas amastigotas intracelulares nos macrófagos infectados. A pentamidina (utilizada como controle positivo) produziu efeito Leishmanicida significativo (figuras 10, 11 e 12), reduziu o índice de infecção (figura 13) e alterou a morfologia dos amastigotas intracelulares (figura 14). Contudo, o Glucantime®, outro fármaco utilizado atualmente no tratamento da Leishmaniose (preconizado pelo Ministério da Saúde) causou diminuição no número de amastigotas e índice fagocítico somente no tempo de 24h, não sendo eficaz após 72h de incubação (figuras 10, 11, 12 e 13). Assim, sugere-se que o Glucantime® não diminuiu a multiplicação dos parasitas no interior dos macrófagos.

A eficácia do Glucantime® na morte dos parasitas intracelulares foi menor no tempo de 72h e essa menor capacidade leishmanicida *in vitro* é relatada na literatura e sugere-se que o metabolismo celular exerça influência nesse efeito final. Diversos estudos atribuem o efeito terapêutico e tóxico do Glucantime® à sua forma trivalente (SbIII). Sendo um pró-fármaco, o Glucantime® administrado na sua forma pentavalente (SbV), é biotransformado dando origem ao metabólito ativo trivalente. Por isso, a capacidade metabólica celular influenciaria na dinâmica da eficácia do Glucantime® de uma forma relevante (SAMPAIO et al., 1997; LIMA et al., 2007; VÁSQUEZ et al., 2006, 2008; FREZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009; VILA-NOVA et al., 2011; PELAEZ et al., 2012; COELHO et al., 2016; PEREZ-FRANCO et al., 2016).

O Pam3CSK4 é um lipopeptídeo agonista dos TLR-1 e -2 e após incubação por 24h ou 72h, foi verificada uma diminuição no número de amastigotas

intracelulares (figura 11) e também no índice fagocítico (figura 13). A associação ao Glucantime® não produziu efeito aditivo. Assim, sugere-se que o efeito observado ocorreu pela estimulação dos TLR-2 pelo agonista em questão. Como descrito por Silvestre e colaboradores (2009) a ativação dos TLR-2 na infecção por *Leishmania* produz aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos B (IL-12 e TNF-alfa) e na produção de óxido nítrico, aumentando o poder parasiticida dos macrófagos e incrementando a resposta das células NK, mediante ativação desse receptor via LPG. Ademais, segundo os autores, o uso de agonista SIR2RP1, aumentou a resposta TH1 e induziu aumento na maturação de células dendríticas durante a infecção por *Leishmania*.

Estudos têm demonstrado a importância do TLR-2 na infecção por *Leishmania*, uma vez que parasitos da espécie *L. donovani* podem diminuir a produção de IL-2 por inibir a via da p38 MAPK e promover o aumento da produção de IL-10 via ERK1/2 (fosforiladas através da ligação de agonistas aos TLR), diminuindo assim a resposta inflamatória frente à infecção pelo parasito. Também foi observado que a inibição da via ERK1/2 pelo inibidor U0126 na infecção por *L. amazonensis* em macrófagos reverte parcialmente a ativação desta via provocada pelo *Leishmania* e produz diminuição da multiplicação do parasita e da progressão da lesão (YANG; MOSSER; ZHANG, 2007; CHANDRA; NAIK, 2008; TUON et al., 2012).

Além disso, agonistas de TLR-2 têm sido empregados como adjuvantes vacinais contra patógenos como o *Mycobacterium tuberculosis*. A proteína recombinante CSU-F36, uma agonista do TLR-2 demonstrou efeito satisfatório como adjuvante por aumentar a ativação dos macrófagos e a produção de IL-12, bem como, por estimular a expansão clonal de linfócitos T responsáveis por secretar IFN-gama, modulando de forma positiva a resposta imunológica do hospedeiro (WANG et al., 2007).

Em um estudo semelhante realizado por Chandra e Naik (2008), foram utilizados o LPS e um agonista de TLR-2 Pam3cys (semelhante ao Pam3CSK4) para estimular monócitos humanos (LPS 10ng/mL e Pam3cys 10ng/mL) e de linhagem THP-1 (LPS 1µg/mL e Pam3cys 1µg/mL) infectados por *L. donovani*. Foi observado um aumento na produção de IL-10 e IL-12 em monócitos humanos quando comparado ao controle sem tratamento. Porém, a infecção pelo parasito limitou a produção de IL-12 e aumentou a produção de IL-10 quando comparado

com as células estimuladas, mas não-infectadas. Esse perfil observado pelos autores, sugerem um papel inibidor da resposta Th1 pelo parasito, mesmo na presença de agonistas dos TLR-2 e -4, sendo a supressão mais expressiva nas células estimuladas com o agonista de TLR-2.

No presente estudo, foi observada uma diminuição na infecção dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e do número de amastigotas intracelulares utilizando LPS 25ng/mL e Pam3CSK4 25ng/mL. É possível que esse fenômeno se deva à alteração no padrão de resposta imunológico dos macrófagos quando tratados com agonistas de TLR aumentando assim a produção de TNF-alfa (figura 15), que pode induzir o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que responsáveis pela eliminação do parasito (TRACEY et al., 2008).

O LPS possui um papel importante na resposta imunológica contra patógenos mediada pelo TLR-4. O LPS induz aumento na produção de IFN-gama e consequentemente do óxido nítrico por estimular a ação da iNOS. O NO, por sua vez, é capaz de formar o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) desempenhando ação tóxica ao material genético e aos fosfolipídeos de membrana. Contudo, conforme descrito na literatura, o *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis* possuem mecanismos responsáveis por diminuir a síntese de NO ou proteger-se do estresse oxidativo causado por esse composto (BALESTIERI et al., 2002; DOLAI et al., 2009; GHOSHAL et al., 2010; TOMÁS; CASTRO, 2013; CALEGARI-SILVA et al., 2009, 2015; OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015).

O LPS diminuiu o número de amastigotas intracelulares (figura 10), bem como o índice infecção (figura 12) e a morfologia dos parasitas fagocitados (figura 14). A alteração na morfologia dos amastigotas intracelulares pode se dar pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico e superóxido (após estimulação do TLR-4, por exemplo) que são essenciais no controle da infecção por *L. amazonensis* e produzem danos à membrana do parasito (MUKBEL et al., 2007).

A estimulação de macrófagos de pacientes assintomáticos com LPS + IFN-gama diminuiu levemente o índice fagocítico e o número de amastigotas nas células infectadas por *Leishmania chagasi* sensível ao NO (cepa LVHSE-07) após 72h. Porém, o mesmo efeito não foi observado após 2h ou 96h de estímulo. Vale ressaltar que a cepa utilizada neste estudo era sensível ao NO, por isso, há menor

possibilidade da resistência parasitária ter influência na ação do LPS + IFN-gama (PASSOS, 2012).

Agallou e colaboradores (2014) testaram o efeito da estimulação dos TLR-4 na infecção por *L. infantum*. Neste estudo foi observado que a incubação de macrófagos infectados por *L. infantum* com o LPS restaura parcialmente a capacidade da célula em produzir IL-12, NO e TNF-alfa. Essa capacidade diminui devido à ação do parasito em diminuir a resposta inflamatória em seu favor. De acordo com os autores, a restauração da produção de NO resultou numa diminuição na taxa de infecção dos macrófagos estimulados.

Por outro lado, foi demonstrado que parasitos *L. mexicana* podem inibir vias específicas como JNK e ERK através da ação de uma cisteína peptidase B nos macrófagos infectados, alterando assim a sinalização intracelular mediada pelo NF- $\kappa$ B. Esse efeito foi responsável por diminuir a produção de IL-12 mesmo na presença de um indutor como o LPS em alta concentração (1 $\mu$ g/mL). Assim, é possível notar que as espécies de *Leishmania* possuem importantes mecanismos de escapes que dificultam o controle adequado da infecção (CAMERON et al., 2004).

A importância da susceptibilidade do *Leishmania* ao NO foi demonstrada por Souza e colaboradores (2010) que associaram à resistência dos parasitos ao NO com a resposta inadequada à terapia com os fármacos antimoniais, levando à uma piora do quadro clínico do paciente. Os autores demonstraram que a estimulação de macrófagos humanos de pacientes (refratários ao tratamento com antimoniais) por LPS + IFN-gama causou uma diminuição no número de amastigotas intracelulares, na porcentagem de macrófagos infectados com *L. braziliensis* (susceptíveis ao NO) e na produção de TNF-alfa após 120h. Porém esse fenômeno não foi observado nos macrófagos de pacientes que respondem ao tratamento com os fármacos antimoniais. Assim, sugere-se que a ação das espécies reativas de oxigênio possui papel importante no desfecho clínico de pacientes tratados com os atuais fármacos disponíveis na terapia anti-*Leishmania*.

Voo e colaboradores (2014) avaliaram o efeito de diversos ligantes de TLR sobre a proliferação de células T, B e NK. O Pam3CSK4, LPS e o CL075 bloquearam a supressão da proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> mediada pelos linfócitos Treg. O Pam3CSK4 provocou aumento na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e diminuição da IL-10. O CL075 induziu aumento da atividade citotóxica das células NK. Assim, os autores sugerem que, assim como outros ligantes, estes três

poderiam servir como adjuvantes imunoterapêuticos para aumentar as atuais estratégias terapêuticas disponíveis. Contudo, os efeitos nocivos e o possível desequilíbrio imunológico provocado por tais ligantes ainda são dúvidas a serem esclarecidas.

No presente estudo o CL075 causou diminuição no número de amastigotas intracelulares (figura 12 e 14) e no índice fagocítico (figura 13) quando utilizado isoladamente ou em associação ao Glucantime® após 24h ou 72h. Há uma escassez de estudos que avaliem a influência dos TLR-7 e -8 na infecção por *Leishmania*. Por isso, há uma dificuldade na comparação desses resultados. Contudo, é sabido que o CL075 (agonista de TLR-7 e -8) participa no processo inflamatório, aumentando a produção de citocinas conforme descrito abaixo.

O CL075 contribui para a polarização da resposta Th1, produzindo altos níveis de IL-12 e aumentando a secreção de IFN-gama, além de incrementar a ativação de células NK. Esses efeitos foram ainda maiores quando houve associação com o ácido policitidílico (agonista de TLR-3) devido a ação co-estimulatória. Além disso, não houve aumento da produção de IL-10. Outros estudos mostraram que o CL075 induz significativamente a produção das citocinas: IL-1beta, IL-10, IL-12 e TNF-alfa em células dendríticas mielóides e monócitos humanos, pela ativação do TLR-7 em co-cultura e induz a maturação e ativação das células apresentadoras de antígenos (LANRANGÉ et al., 2009; SPRANGER et al., 2010; UPCHURCH et al., 2015).

É importante ressaltar que além dos macrófagos obtidos do peritônio de camundongos, existe uma importante população de células que podem ser recuperadas nessa região, as células B1. Essas células são uma subpopulação de células B que se comportam como fagócitos, e possuem receptores de manose e do complemento 3. Além disso, como têm sido demonstrado na literatura, essas células possuem uma elevada capacidade de fagocitar parasitos da espécie *L. amazonensis* (com possível influência do receptor de manose), caracterizada por um alto índice fagocítico (GERALDO et al., 2016).

Atualmente, existem diferentes estratégias terapêuticas a serem exploradas na tentativa de desenvolver uma vacina altamente eficaz ou um tratamento mais seguro. Entre essas estratégias, algumas utilizam a modulação do sistema imunológico para melhorar a resposta do hospedeiro frente à infecção. Um dos agentes avaliados foi o imiquimod (agonista de TLR-7) que atua como

imunomodulador. Entretanto, os estudos não têm sido conclusivos. Enquanto foi verificada uma boa eficácia em modelos experimentais, a utilização em seres humanos não provocou melhora nos pacientes infectados por *Leishmania tropica*, mesmo associado ao Glucantime® (FIROOZ et al., 2006).

Outros estudos em pacientes com Leishmanioses causadas por *L. peruviana*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* tratados com os antimoniais associados ao imiquimod não verificaram diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo, ou a eficácia foi baixa, sem grande diferença com os tratamentos atualmente disponíveis. Outra limitação foi o baixo número de pacientes incluídos no estudo, sugerindo que, apesar dos resultados serem promissores, devem ser avaliados em estudos com população maior e mais abrangente (MIRANDA-VERASTEGUI et al., 2005, 2009; AREVALO et al., 2007).

Um estudo promissor, testou uma vacina produzida com cepas de *L. amazonensis* atenuadas administrada diariamente associada ao Glucantime® por diferentes vias de administração em comparação com um grupo tratado somente com o Glucantime®. Foi verificado que a vacina produziu cura de 100% dos pacientes comparado com 8,2% tratados somente com a quimioterapia (MACHADO-PINTO et al., 2002).

Cabe ressaltar que, a utilização de vacinas como a citada anteriormente pode produzir melhores efeitos com a utilização de adjuvantes vacinais que possam incrementar a apresentação de antígenos pelas APC e a produção de IL-12 induzindo o desenvolvimento de uma resposta imunológica do perfil Th1. Assim, um melhor entendimento da ação dos ligantes de TLR durante a infecção por *Leishmania* pode contribuir para o estudo de novas estratégias terapêuticas e vacinais (OKWOR; UZONNA, 2009; SINGH; SRIVASTAVA; SINGH, 2012).

Esses achados sugerem que os ligantes testados podem ser moléculas importantes para esclarecer a participação dos TLR na infecção por *L. amazonensis*, uma vez que, a ativação de tais receptores provocou diminuição da infecção dos macrófagos murinos e no índice fagocítico nestas células. Estudos posteriores utilizando os TLR-2, 4, 7 e 8 são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos intracelulares que envolvem os efeitos parasiticidas dos ligantes testados (ou análogos) e a associação desses ligantes.

## 6 CONCLUSÕES

Os ligantes de TLR (LPS, Pam3CSK4 e CL075) não apresentaram citotoxicidade significativa quando utilizados isoladamente ou em associação ao Glucantime® em macrófagos de linhagem J774.A1.

Os ligantes de TLR (LPS, Pam3CSK4 e CL075) diminuíram o número de macrófagos infectados, o índice fagocítico e o número de amastigotas intracelulares em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*.

Os ligantes de TLR (LPS e CL075) aumentaram a produção de TNF-alfa após incubação por 72h, mas nenhum dos ligantes nas concentrações testadas induziram aumento da produção de IL-10 e IL-12.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ACHEK, A.; YESUDHAS, D.; CHOI, S. Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. **Arch Pharm Res**. v.39, p.1032-49, 2016.
- AFONSO, L. C. C. et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**. v. 263, p. 235–37, 1994.
- AGALLOU, M. et al. Toll-like receptor 4 promotes control of *Leishmania infantum* infection through inducement of leishmanicidal activity in host macrophages: role of mitogen activated kinases. **J Biol Regul Homeost Agents**. v.28, p.41-52, 2014.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**. v. 4, p. 499-511, 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. v.24, p.783-801, 2006.
- ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **J Intern Med**. v. 261, p. 511-28, 2007.
- ALIPRANTIS, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. **Science**, v. 285, p. 736-9, 1999.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloSONE** v. 7, e. 35671, 2012.
- ANDERSON, C. F. et al. CD4+CD25–Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med**. v. 204, p. 285–297, 2007.
- ARAUJO, A. R.; et al. RISK FACTORS ASSOCIATED WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN AN ENDEMIC AREA OF BRAZIL. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v.8, p.58-86, 2016.
- AREVALO, I. et al. Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis** v.44, p.1549–1554, 2007.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**. v.30, p.1269-81, 2000.
- ASHOUR, D. S. Toll-like receptor signaling in parasitic infections. **Expert Rev Clin Immunol**. v.11, p.771-80, 2015.
- BADIEE, A. et al. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. **Vaccine**. v.21, p.735-49, 2013.

- BAGIROVA, M. et al.. Overview of dendritic cell-based vaccine development for leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v.38, p.651-662, 2016.
- BAINS, A. et al. Unusual presentation of mucocutaneous leishmaniasis in HIV-infected patient. **Indian J Sex Transm Dis.** v.37, p.193-196, 2016.
- BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect.** v.4, p.23-29, 2002.
- BARBIER, J.; CINTRAT, J.; GILLET, D. Intracellular pathogens convert macrophages from death traps into hospitable homes. **FEBS Journal**, v. 283, p. 595-597, 2016.
- BARBIÉRI, C. L. et al. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infect Immun.** v.61, p.2131-7, 1993.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 7, p. 328-337, 2004.
- BASTOS, T. S. A.; LINHARES, G. F. C.; MADRID, D. M. C. IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FLEBOTOMÍNEOS CAPTURADOS EM ÁREA URBANA. **Ciênc. anim. bras.** v. 17, p. 395-401, 2016.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol.** v.37, p.1097-106, 2007.
- BECKER, I. et al. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molec Biochem Parasit**, v. 130, p. 67-74, 2003.
- BEHZADI, E.; BEHZADI, P. The role of toll-like receptors (TLRs) in urinary tract infections (UTIs). **Central European Journal of Urology.** v.69, p.404-410, 2016.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin Infect Dis.** v. 24, p. 684–703, 1997.
- BHATTACHARYA, P. et al. Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. **J Infect Dis.** v.202, p.145-55, 2010.
- BLUM-DOMÍNGUEZ, S. D. et al. [Diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and visceral leishmaniasis (VL) concurrent with cancer: Presentation of a case]. **Gac Med Mex.** v.153, p.121-124, 2017.
- BOGDAN, C; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Evasion Strategies of *Leishmania* Parasites. **Parasitology Today.** v.6, p. 183-187, 1990.
- BORGHI, S. M. et al. *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitol Res.** v.116, p.465-475, 2017.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.

BUCHANAN, R. M. et al. IL-12-mediated increases in protection elicited by pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines. **Vaccine**. v.19, p.2020–2028, 2001.

CALDEIRA, L. R. et al. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: a new approach for the treatment of leishmaniasis. **Eur J Pharm Sci** v.70, p.125-131, 2015.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. **Immunol Lett**. v.2, p.19-26, 2009.

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. The human parasite *Leishmania amazonensis* downregulates iNOS expression via NF-κB p50/p50 homodimer: role of the PI3K/Akt pathway. **Open Biol**. v.5, p.1501-18, 2015.

CAMERON, P. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. **J Immunol**. v.173, p.3297-304, 2004.

CAMPOS, M. A. S.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O. et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**. v. 167, p. 416-423, 2001.

Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), 2006. Disponível em: <phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=10275>.

CEZARIO, G. A. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Mem Instit Oswaldo Cruz** v.106, p.573-583, 2011.

CHANDRA, D., NAIK, S. *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. British Society for Immunology, **Clin Exp Immun**, v. 154, p. 224– 234, 2008.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. et al. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Rev Soc Bras Med Trop** v.48, p.235-242, 2015.

CHEUKA P. M. et al. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**. v.31, pii:E58, 2016.

COELHO, D. R. et al. In vivo and in vitro effects of pentavalent antimony on mouse liver cytochrome P450s. **Hum Exp Toxicol**. pii: 0960327116637110, 2016.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. et al . Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amaz**. v. 47, p. 39-46, 2017.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experiment Molec Pathol.** v. 72, p. 132-141, 2002.

D'AGOSTINO, P. et al. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. **Int Immunopharmacol.** v.1, p.1765-76, 2005.

DASGUPTA, S.; AGHAZADEH-DIBAVAR, S.; BANDYOPADYAY, M. The role of toll-like receptor agonists in the immunotherapy of leishmaniasis. An update and proposal for a new form of anti-leishmanial therapy. **Ann Parasitol.** v.60, p.75-82, 2014.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Front Immun.** v.7, p.151, 2016.

DOLAI, S. et al. Overexpression of mitochondrial Leishmania major ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress- induced programmed cell death and protein damage. **Eukaryotic cell.** v.8, p.1721- 1731, 2009.

DUARTE, M. C. et al . Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 49, p.398-407, 2016.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current opin in microb,** v. 26, p. 32-40, 2015.

DZAMITIKA, S. A. et al. Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance. **Chem Biol Interact.** v.160, p.217-24, 2006.

EHRlich, A. K. et al. Local Delivery of the Toll-Like Receptor 9 Ligand CpG Downregulates Host Immune and Inflammatory Responses, Ameliorating Established Leishmania (Viannia) panamensis Chronic Infection. **Infect Immun.** v.23, pii:e00981-16, 2017.

ESHETU, E.; BASSA, A. A. T. The Public Health Significance of Leishmaniasis: An Overview. **The Public,** v. 6, 2016.

FAGUNDES-SILVA, G. A. et al . Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 110, p. 797-800, 2015.

FALCÃO, S. A. C. et al. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. **Frontiers in Immunology,** v.7, p. 287, 2016.

FARINA, C. et al. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. **International Immunol,** v. 16, p. 799-809, 2004

FIGUEIRA, L. P. et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by Leishmania (Viannia) naiffi in the Amazon region, Brazil. **Acta Amaz.** v. 47, p. 47-52, 2017.

FIROOZ, A. et al. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for

cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. **Arch Dermatol** v.142, p.1575-9, 2006.

FLANDIN, F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR-2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 411-120, 2006.

FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. Pentavalent antimonials: New perspective for old drugs. **Molecules**. v.14, p.2317-2336, 2009.

GALARDO, A. K. R. et al. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae): potential vectors of American cutaneous leishmaniasis agents in the area associated with the Santo Antônio Hydroelectric System in Western Amazonian Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, p. 265-271, 2015.

GALDINO, H. J. et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* amastigotes induces the expression of TNF $\alpha$  and IL-10 by human peripheral blood mononuclear cells in vitro in a TLR4-dependent manner. **Cytokine**. v.88, p.184-192, 2016.

GARG, R. et al. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylactic potencial in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**. v. 23, p. 1189-1196, 2005.

GERALDO, M. M. et al. In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite Immunol**. v.38, p.365-76, 2016.

GERALDO, M. M. In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite Immunol**. v.38, p.365-76, 2016.

GHOSHAL, A. et al. Sialic acids in different *Leishmania* sp., its correlation with nitric oxide resistance and host responses. **Glycobiology**, v. 20, p.553-566, 2010.

GIAIMIS, J. et al. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **J Immunol Methods**. v. 154, p. 185-193, 1992.

GODOY, R. E. et al. Aspects on the Ecology of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Guaraí, State of Tocantins, Brazil, Endemic Area for American Cutaneous Leishmaniasis. **J Med Entomol**. v.54, p.229-235, 2017.

GOLDMAN, M. Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. **Clin Exp immunol**. v. 147, p. 208-16, 2007.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. bras. epidemiol**. v. 7, p.338-349, 2004.

GORDEN, K. B. et al. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. **J Immunol**. v. 174, p.1259-68, 2005.

GORDON, S.; UNKELESS, J.C.; COHN, Z.A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two stage process. **J of Experiment Med.** v. 140, p. 995-1010, 1974.

GORSKI KS, W. E. L. et al. Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists. **Int Immunol.** v.18, p.1115-26, 2006.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. Innate immunity against Leishmania infections. **Cell Microb.** v.17, p.1286-1294, 2015.

HALLIDAY, A. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. **Parasit Vectors.** v.6, p.532, 2016.

HAN, J. et al. Characterization of the structure and immunostimulatory activity of a vaccine adjuvant, de-o-acylated lipooligosaccharide. **PLoS One.** v. 22, e85838, 2014.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends Parasitol.** v.18, p. 332–334, 2002.

HASHIGUCHI, Y. et al. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Trop Med Health.** v.14, p.44, 2016.

HENNESSY, E. J.; PARKER, A. E.; O'NEILL, L. A. J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature Rev Drug Discov.** v. 9, p. 293- 307, 2010.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.** v.354, p.1191-99, 1999.

ISLAN, G. A. et al. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? **Acta Trop.** v.170, p.16-42, 2017.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat immunol.** v. 11, p. 373-84, 2010.

KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Rev Microb.** v. 9, p. 604–615. 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **J. Glob. Infect. Dis.** v. 2, p. 177–185, 2010.

KHAMESIPOUR, A. Therapeutic vaccines for leishmaniasis. **Expert Opin Biol Ther.** v.14, p.1641-9, 2014.

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **Int J Parasitol** v.37, p.1087-1096, 2007.

KOIKE, A. et al. Nitric oxide is an important regulator of heme oxygenase-1 expression in the lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ -treated murine macrophage-like cell line J774.1/JA-4. **Biol Pharm Bull.** v.38, p.7-16, 2015.

KROPF, P. et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect. Immun.** v.72, p.1920-8, 2004.

LARANGÉ, A. et al. TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. **J Leukoc Biol.** v.85, p.673-83, 2009.

LI, J. et al. The first successful report of the in vitro life cycle of Chinese *Leishmania*: the in vitro conversion of *Leishmania amastigotes* has been raised to 94% by testing 216 culture medium compound. **Acta Parasitol.** v.62, p.154-163, 2017.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**; v. 82, p. 111-24, 2007.

LIMA, M. V. N. et al. Leishmaniose cutânea com desfecho fatal durante tratamento com antimonial pentavalente. **An. Bras. Dermatol.** v. 82, p. 269-271, 2007.

LYRA, M. R. et al. FIRST REPORT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* IN AN URBAN AREA OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** v. 57, p. 451-454, 2015.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmanin amazonensis* vaccine plus antimonial. **Int J Dermatol** v.41, p.73-8, 2002.

MARTINS, V. T. et al. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania amastigote*-specific protein, member of the superoxygenase family, against visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** v.7, e2148, 2013.

MEARS, E. R. et al. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.3, e0003889, 2015.

METZGER, D. W. Interleukin-12 as an Adjuvant for Induction of Protective Antibody Responses. **Cytokine.** v.52, p.102-107, 2010.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature.** v. 442, p. 39-44, 2006.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J. Exp. Med.** v. 201, p. 747–754, 2005.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin Infect Dis** v.40, p.1395–1403, 2005.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. First-line therapy for human cutaneous leishmaniasis in Peru using the TLR7 agonist imiquimod in combination with pentavalent antimony. **PLoS Negl Trop Dis.** v..3, e491, 2009.

MOAL, L. et al. *Leishmania* hijacking on the macrophage intracellular compartments. **FEBS Journal** v.283, p.598–607, 2016.

- MOHAMMADPOUR I. et al. Lip leishmaniasis: a case series with molecular identification and literature review. **BMC Infect Dis.** v.25, p.96, 2017.
- MOMOTANI, E. et al. The effect of oligosaccharides on the production of tumor necrosis factor-alpha by macrophage-like cell line J774/JA-4. **J Vet Med Sci.** v.60, p.519-22, 1998.
- MONTALVO, A. M. et al. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. **Rev Cubana Med Trop,** v. 64, p. 108-131, 2012.
- MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg.** v.76, p.669-75, 2007.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. Immunotherapy as a strategy for treatment of leishmaniasis: a review of the literature. **Immunotherapy.** v.1, p.765-76, 2009.
- OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends Parasitol.** v.31, p.653-64, 2015.
- OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **PNAS.** v.97, p.13766-71, 2000.
- PANAGOPOULOS, P. et al. Visceral leishmaniasis during pregnancy: A rare case report from Greece. **PLoS Negl Trop Dis.** v.16, e0005134, 2017.
- PARKER, L. C.; PRINCE, L. R.; SABROE, I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. **Clin Exp immunol.** v. 147, p. 199-207, 2007.
- PASSOS, C. S. Avaliação da atividade leishmanicida de macrófagos isolados de indivíduos tratados e assintomáticos para Leishmaniose Visceral. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.
- PEACOCK C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics.** v.39, p.839-847, 2007.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infect Dis** v.22, p. 1-13, 1996.
- PELAEZ, R. G. et al. Expresión diferencial de proteínas en *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* asociadas con mecanismos de resistencia a antimonio de meglumina. **Biomédica,** v. 32, p. 418-429, 2012.
- PEREZ-FRANCO, J. E. et al. Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. **PLoS Negl Trop Dis.** v.31, e0004739, 2016.



REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol** 55, 803-810, 1998.

RONET, C. et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. **J. Immunol.** v. 184, p. 886–894, 2010.

ROUGERON, V.; DE MEEÛS, T.; BAÑULS, A. L. Reproduction in *Leishmania*: A focus on genetic exchange. **Infect Genet Evol.** pii:S1567-1348(16)30422-1, 2016.

SAMPAIO, R. N. R. et al. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40mg SbV/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v.30, p.457-63, 1997.

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. **J Immunol.** v. 154, p. 5320–30, 1995.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol.** v.16, p.581-92, 2016.

SILVA-JARDIM, I.; HORTA, M. F.; RAMALHO-PINTO, F. J. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta Trop.** v. 91, p. 121-130, 2004.

SILVESTRE, R. et al. The contribution of Toll-like receptor 2 to the innate recognition of a *Leishmania infantum* silent information regulator 2 protein. **Immunol.** v. 128, p. 484-499, 2009.

SINAN. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de Saúde (TABNET). Epidemiológicas e morbidades. **Leishmaniose Tegumentar Americana – Casos confirmados notificados no SINAN de 2010 a 2015.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>. Acessado em: 13/03/2017.

SINGH, K.; GARG, G.; ALI, V. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Curr Drug Metab.** v.17, p.897-919, 2016.

SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, N. Toll-like receptor signaling: a perspective to develop vaccine against leishmaniasis. **Microbiol Res.** v.167, p.445-51, 2012.

SMILEY, S. T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. **Expert Rev Vaccines.** v.7, p.209–221, 2008.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- $\alpha$  production. **BMC Infect Dis.** v.10, p.209, 2010.

SPRANGER, S. et al. Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. **J Immunol.** v.185, p.738-47, 2010.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors.** v.15, p.82, 2017.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therap Adv Infect Dis.** v.3, p. 98-109, 2016.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol.** v.16, p. 3-9, 2004.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TELES, C. B. G. et al . MOLECULAR CHARACTERIZATION OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE TRI-BORDER AREA OF ASSIS BRASIL, ACRE STATE, BRAZIL. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 57, p. 343-347, 2015.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling.** v.19, p.696-707, 2013.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacol Ther**, v.117, p.244-279, 2008.

TUON, F. F. B. Identificação e quantificação da expressão de receptores toll-like 2, 4, e 9 na leishmaniose cutânea humana. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TUON, F. F. et al. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. **Rev Instit Med Trop de São Paulo** v.54, p.159-163, 2012.

TUON, F. F.; AMATO, V. S.; BACHA, H. A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M. I.; AMATO NETO, V. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infect Immun.** v. 76, p. 866-72, 2008.

UPCHURCH, K. C. et al. New TLR7 agonists with improved humoral and cellular immune responses. **Immunol Lett.** v.168, p.89-97, 2015.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A., et al. Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. **Infect Immun** v.77, p. 2948-2956, 2009.

VÁSQUEZ, L. Disposición farmacocinética de las especies de antimonio en perros después de una dosis de antimoniato de meglumina (Glucantime®). **Bol. Mal. Salud Amb.** v.48, p.27-33, 2008.

VÁSQUEZ, L. et al. Pharmacokinetic of experimental pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. **Curr. Thera. Res.** v.67, p.193-203, 2006.

VEER, M. J. et al. Myd88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan in toll-like receptor 2 signaling. **Europ J of Immun.** v. 33, p. 2822-2831, 2003.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nat Protoc.** v.1, p.1112-6, 2006

VILA-NOVA, N. S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 44, p. 567-571, 2011.

VOO, K. S. et al Targeting of TLRs inhibits CD4+ regulatory T cell function and activates lymphocytes in human peripheral blood mononuclear cells. **J Immunol.** v.15, p.627-34, 2014.

WANG, B. et al. A Toll-Like Receptor-2-Directed Fusion Protein Vaccine against Tuberculosis. **Clin Vacc Immun.** v.14, p.902-906, 2007.

WATTS, C.; WEST, M. A.; ZARU, R. TLR signaling regulated antigen presentation in dendritic cells. **Curr Opin Immunol.** v.4, p.124-30, 2010.

WHO. Leishmaniasis. Epidemiologic situation. 2016. Disponível em: <[www.who.int/leishmaniasis/burden/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/)>. Acessado em 18/11/2016.

YAGHOOBI-ERSHADI, M. Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Iran and their Role on *Leishmania* Transmission. **J Arthropod-Borne Dis.** v.6, p.1-17, 2012.

YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* Infection of Macrophages. **J Immunol.** v.178, p.1077–85, 2007.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Mol Biochem Parasitol.** v.132, p.1-16, 2003.